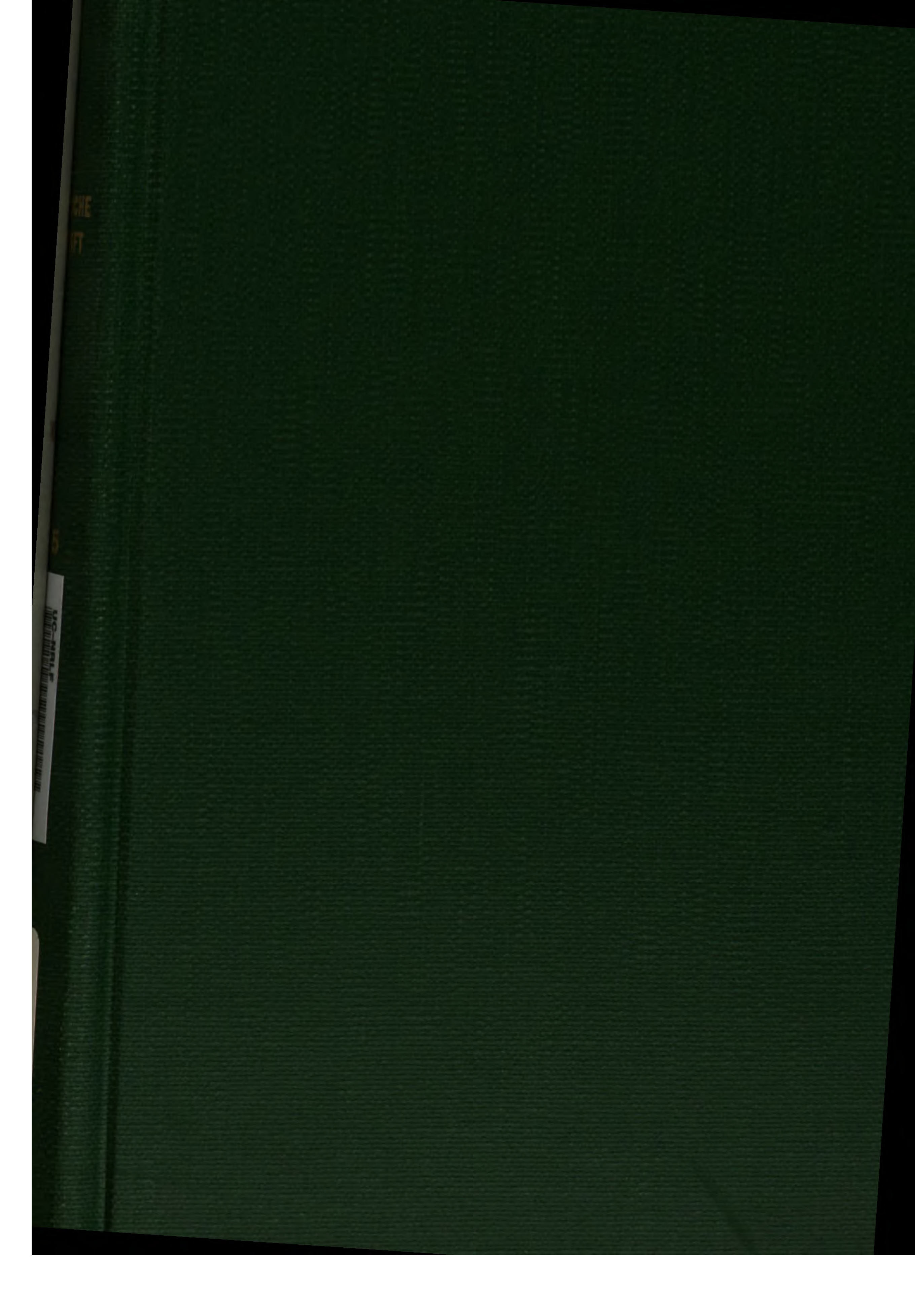
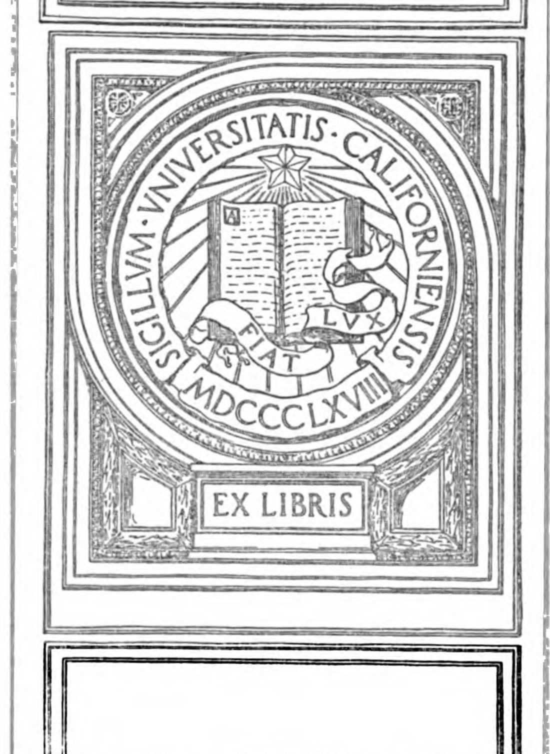








Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertfünfundfünfzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1925

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhalt.

Biochemische Zeitschrift

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertfünfundfünfzigster Band

Erstes und zweites Heft

Ausgegeben am 24. Januar 1925



Berlin

Verlag von Julius Springer

1925

Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten and höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber,
Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,
zu richten.

Die Verfasser erhalten bis 100 Sonderabdrucke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von 1½ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur bis 75. Doch bittet der Verlag, nur die zur tatsächlichen Verwendung benötigten Exemplare zu bestellen. Über die Freiexemplare hinaus bestellte Sonderdrucke werden berechnet. Die Herren Mitarbeiter werden jedoch in ihrem eigenen Interesse dringend gebeten, sich, wenn irgend möglich, mit der kostenfrei zur Verfügung gestellten Anzahl zu begnügen, und falls mehr Exemplare unbedingt erforderlich sind, deren Kosten vorher vom Verlage zu erfragen, um unliebsame Überraschungen zu vermeiden.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer
Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

155. Band. **Inhaltsverzeichnis.** **Heft 1/2.**

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Zur Frage über die Rolle der Aschenbestandteile in den Pflanzen.

II. Mitteilung:

Das Einwirken von Neutralsalzen auf die Peroxydase.

Von

A. J. Smirnow.

(Aus dem agrikulturchemischen Laboratorium der landwirtschaftlichen Akademie Moskau.)

(Eingegangen am 13. November 1924.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Bereits bei den Untersuchungen über die langsame Oxydation [*Schönbein*[1]), *Traube*[2]), *Spitzer*[3])] wurde angenommen, daß die Faktoren, welche diesen Prozeß in den Organismen beschleunigen, eine wichtige Rolle bei der Atmung spielen. (Unter solchen Faktoren versteht man gegenwärtig die Oxydationsfermente.) Es blieb aber lange Zeit unbekannt, welche Stoffe im lebenden Organismus durch diese Fermente oxydiert werden können. Die gewöhnlichen Komponenten lebender Zellen, Eiweißverbindungen, Kohlenhydrate und Fette werden durch die Oxydasen nicht angegriffen. Letztere vermögen nur Polyphenole und aromatische Amine (und zwar auch nur oberflächlich) zu oxydieren, welche nach Ansicht vieler Forscher nur eine geringe Rolle in den Organismen spielen.

Dies gab einigen Forschern Veranlassung, den oxydierenden Fermenten überhaupt jegliche Rolle im Stoffwechsel der lebenden Zelle abzusprechen[4]). Im Jahre 1910 zeigte *S. Kostytschew*[5]), daß die primären Produkte der Glucosegärung durch das System *Peroxydase* + H_2O_2 bis zu CO_2 und H_2O oxydiert werden. Wasserstoffsuperoxyd allein vermag ohne Anwesenheit von Peroxydase eine derartige Wirkung nicht herbeizuführen. *Kostytschew*

---

[1]) Zeitschr. f. Biol. **1**, 273, 1865; **2**, 1, 1866; **3**, 140, 325, 1867; **4**, 367, 1868.

[2]) Ber. d. chem. Ges. **10**, 1984, 1877.

[3]) Pflügers Arch. **67**, 615, 1897.

[4]) *C. Oppenheimer*, Die Fermente **2**, 754 bis 873, 1913.

[5]) *S. Kostytschew*, diese Zeitschr. **23**, 137, 1910; Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**, 116, 1910.

hat nicht nur die physiologische Rolle der Peroxydase aufgeklärt (und somit auch allgemein diejenige der Oxydasen aus der Gruppe der Phenolasen nach der Terminologie von *A. Bach*), sondern auch eine neue Bestätigung für den Zusammenhang, der zwischen der Alkoholgärung, der anaeroben (intramolekularen) und aeroben Atmung besteht, gegeben. Die intermediären Gärungsprodukte (und wohl auch diejenigen der Atmung) sind nach *Kostytschew* nichts anderes als Akzeptoren[1]) im Prozeß der physiologischen Oxydation, welche durch die Aktivierung des Sauerstoffs der primären Peroxyde (Oxygenasen) unter der Einwirkung der Peroxydase zustande kommt. Im komplizierten Vorgang der Atmung spielen also die Oxydasen (*Peroxydase* + *Peroxyd*) eine wichtige Rolle; sie oxydieren aber dabei nicht die Ausgangsprodukte, die Kohlenhydrate, sondern die intermediären Spaltungsprodukte derselben, die während des Abbaus ohne Zutritt von Sauerstoff in der pflanzlichen Zelle gebildet werden. Diese Produkte, die bei der sauerstofffreien Umsetzung der Kohlenhydrate entstehen, scheinen, wie die Mehrzahl intermediärer Produkte, äußerst labile Verbindungen zu sein. Die Anwesenheit von Sauerstoff und von Oxydasen im Moment der Entstehung dieser labilen Produkte bestimmt auch das Endergebnis des ganzen Vorgangs. Die an Oxydasen reichen höheren Pflanzen bilden ohne Zutritt von Sauerstoff Alkohol. Die an Oxydationsfermenten armen Hefen können dagegen auch unter Zutritt von Sauerstoff die Verbrennung nicht restlos bis CO_2 und H_2O durchführen. Es scheint, daß die Hefen nicht so viel Oxydationsfermente besitzen, um die aus den Kohlenhydraten hervorgegangenen intermediären labilen Produkte im Moment ihrer Entstehung restlos zu oxydieren. Bei höheren Pflanzen werden dagegen die gebildeten intermediären Produkte sofort und vollständig oxydiert; hier verlaufen beide Vorgänge, die Entstehung labiler Produkte und ihre Oxydation, übereinstimmend[2]).

---

[1]) Nach der Terminologie von *Luther* und *Schilow*, Zeitschr. f. physik. Chem. **46**, 777, 1903.

[2]) Nach *Palladin* wirken die Oxydasen nicht unmittelbar auf die Produkte der Kohlenhydratspaltung ein; durch die Oxydasen wird der Phenolwasserstoff der Chromogene angegriffen. Diese Oxydationsprodukte der Chromogene (Atmungspigmente) stellen nicht nur Akzeptoren für den Wasserstoff der Spaltungsprodukte der Kohlenhydrate dar, sondern sind gleichzeitig auch Akzeptoren für den Wasserstoff des Wassers; der durch diesen Vorgang frei gewordene Sauerstoff des Wassers fungiert in der Form freier Atome und wird für die Kohlenstoffoxydation des Atmungsmaterials vollkommen verbraucht. Selbst dann, wenn die Oxydation nur auf den Wasserstoff der Polyphenole beschränkt bleibt, ist die wichtige Rolle der Oxydasen im Prozeß der Atmung nicht zu leugnen. Ber. d. bot. Ges. **26a**, 125, 1911; Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **1**, 91, 1912; ebendaselbst **2**, 326, 1913; diese Zeitschr. **27**, 442, 1910; Zeitschr. f. physiol. Chem. **55**, 217, 1908. Außerdem spielen die Oxydationsfermente beim Stoffwechsel insofern eine Rolle, als sie die Regeneration von Akzeptoren des Wasserstoffs bewirken; solche Akzeptoren sind z. B. Verbindungen vom Chinontypus. Die Anwesenheit derartiger Verbindungen ist unbedingt erforderlich, um hydrolytische Oxydationsprozesse auszulösen (nach der *Strecker*schen Reaktion). Wir können daher die Rolle der Oxydasen auch folgendermaßen formulieren: Die Oxydasen wirken auf die Geschwindigkeit der hydrolytischen Oxydation der Aminosäuren ein.

In unserer Abhandlung sind wir davon ausgegangen, die Einwirkung von Neutralsalzen auf die Arbeit der Peroxydase zu studieren; im Anschluß daran wollen wir die Rolle der Aschenbestandteile, die von der Pflanze aufgenommen werden, bei der Regulation der Oxydationsprozesse untersuchen. Nach *E. de Stoecklin*[1]) wirken Mineralsalze nicht auf die Arbeit der Peroxydase ein. Die Arbeit der vollen Phenolase (aus Lactarius velereus) wird nach *Bach*[2]) durch Salze in manchen Fällen stark beeinflußt; dabei kann es vorkommen, daß dasselbe Salz je nach dem Substrat, das oxydiert wird, eine verschiedene, manchmal sogar eine entgegengesetzte Wirkung ausübt. Nach *Bachs* Ansicht ist ein derartiges Verhalten der Salze darauf zurückzuführen, daß dieselben mit verschiedenen Substraten Komplexe bilden, die schwerer oder leichter oxydiert werden als das Substrat für sich allein. Also wirken die Salze auch nach *Bach* nicht unmittelbar auf das Ferment ein, sondern auf das oxydierbare Substrat. Nur das freie Jod wirkt nach *Bach* unmittelbar auf die Bildung des Ferments, indem es das Zymogen der Peroxydase aktiviert[3]).

In den oben angeführten Arbeiten wurden die Änderungen von p_H unter dem Einfluß der angewandten Salze nicht berücksichtigt. Daher fehlt die Überzeugung, daß bei diesen Versuchen das Ferment unter gleichen Bedingungen seine Tätigkeit entfaltet hat. Aus den Arbeiten von *G. Bertrand* und Mlle. *M. Rosenband*[4]), *J. Wolff* und *E. de Stoecklin*[5]), *Bach* und *Sbarsky*[6]) ist zu ersehen, daß sich die Oxydationsfermente nicht gleichgültig zur Konzentration von [H˙] verhalten. Um den Einfluß der Reaktion des Mediums auf die Arbeit der Oxydasen festzustellen, kann man sich nicht der kolorimetrischen Methode bedienen, da die Intensität der Färbung der von den Polyphenolen gebildeten löslichen Oxydationsprodukte von der Konzentration [H˙] abhängt. So verändern die Produkte, die bei der Oxydation des Hydrochinons entstehen, mit der Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration ihre Färbung in ähnlicher Weise wie Phenolphthalein.

Die unter der Einwirkung von *Peroxydase* + H_2O_2 rot gefärbte Lösung von Hydrochinon kann durch Zufügen einiger Tropfen n/10 Säure (einerlei welcher) wieder entfärbt werden; setzt man nun der entfärbten Lösung eine äquivalente Menge Alkali hinzu, so erhält die Lösung wiederum dieselbe Farbe. Ein Überschuß von Alkali zerstört die gefärbten Produkte. Die Farbe, welche die Lösung durch die Oxydation von Pyrogallol annimmt, wird durch die Einwirkung von Säure etwas verstärkt, dagegen durch

[1]) *E. de Stoecklin*, Thèse de Genève 1907, zitiert aus *Smorodinzew*, Fermente des Pflanzen- und Tierreichs, Teil II, 1920 (russisch).

[2]) *A. Bach* und *V. Maryanovitsch*, diese Zeitschr. **42**, 417, 1912; s. auch *O. Baudisch*, ebendaselbst **106**, 134, 1920.

[3]) *A. Bach*, Ber. d. chem. Ges. **40**, 230, 1907.

[4]) *G. Bertrand* et Mlle. *M. Rosenband*, Ann. de l'Inst. Pasteur **23**, 314, 1909.

[5]) *J. Wolff* et *E. de Stoecklin*, ebendaselbst, S. 841.

[6]) *Bach* und *Sbarsky*, diese Zeitschr. **34**, 473, 1911.

Alkali wieder abgeschwächt. Bei Verwendung von Salzen wie $CaCl_2$, $MnSO_4$ und $Al_2(SO_4)_3$ wird die Konzentration [H˙] des Reaktionsgemisches verschieden sein, wenn man sie nicht künstlich reguliert. Infolgedessen kann man bei der Beurteilung der Fermentwirkung nach der Färbung irregeführt werden. Hierzu liegt nach unserer Ansicht der Grund, weshalb in den Versuchen von *Bach* und *Marianowitsch*[1]) ein und dasselbe Salz auf die Aktivität des Ferments bei Anwendung verschiedener Substrate verschieden einzuwirken schien. Wird also die Intensität der Oxydationswirkung der Fermente kolorimetrisch bestimmt und bleibt die Reaktion des Mediums dabei unberücksichtigt, so müssen wir die auf diese Weise gewonnenen Resultate zurückhaltend beurteilen.

In unserer Arbeit wählten wir das Pyrogallol als Reagens für die Beurteilung der Peroxydasewirkung. Pyrogallol gibt bei der Oxydation als Endprodukte CO_2 und Purpurogallin:

$$4\,C_6H_6O_3 + O_9 = C_{20}H_{16}O_9 + 4\,CO_2 + 4\,H_2O$$ [2]).

Wie aus der Gleichung ersichtlich ist, kann man die Fermentwirkung entweder nach der entstandenen Kohlensäure oder nach der Menge des während der Reaktion gebildeten Purpurogallins beurteilen. Uns schien die Bestimmung des in Wasser unlöslichen Purpurogallins[3]) sehr bequem zu sein; wir glaubten auch, auf diese Weise genaue Resultate zu erhalten.

Für unsere Versuche mit Peroxydase wurden Weizensamen angewandt. Aus Gründen, die in unserer ersten Mitteilung[4]) angeführt sind, wurde das Ferment nicht isoliert; es wurde in Form eines wässerigen Auszuges für unsere Versuche bereitet und enthielt daher seine natürlichen Beimengungen. Die gemahlenen Weizensamen wurden mit destilliertem Wasser, das im Verhältnis 1 : 50 genommen war, ausgezogen; ferner fügten wir diesem Gemisch ein Antiseptikum, das aus Chloroform und Toluol im Verhältnis 1 : 3,5 bestand, hinzu. Auf je 100 g Wasser kam 1 ccm Antiseptikum. Die gemahlenen Weizensamen wurden während 16 bis 18 Stunden bei Zimmertemperatur mit Wasser extrahiert. Der Extrakt wurde sodann auf einem *Buchner*schen Trichter mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. (Wir bedienten uns dabei eines Filters von *Schleicher* und *Schüll*, „extra hart Nr. 602".) Das klare Filtrat teilten wir in zwei Portionen, von denen die eine während

---

[1]) l. c.

[2]) *G. Andre*, Chemie Végétale **1**, 210, 1924; nach *Willstätter* und *Stoll* ist die empirische Formel des Purpurogallins: $C_{11}H_8O_5$; Liebigs Ann. d. Chem. **416**, H. 1, S. 62, 1918; nach dieser Formel muß die Reaktion so verlaufen: $2\,C_6H_6O_3 + O_3 = C_{11}H_8O_5 + CO_2 + 2\,H_2O$.

[3]) *R. Chodat* und *A. Bach*, Ber. d. chem. Ges. 1903, S. 606; *A. Bach* und *A. Oparin*, diese Zeitschr. **134**, 183, 1922; *Bach* und *Sbarsky*, ebendaselbst **34**, 473, 1911.

[4]) *A. Smirnow* und Fr. *S. Ph. Alissowa*, diese Zeitschr. **149**, 63, 1924.

10 Minuten auf einem siedenden Wasserbade inaktiviert wurde. Zur Untersuchung wurden je 25 ccm des Extraktes genommen und bis 50 ccm mit Wasser oder der Lösung eines Stoffes, dessen Wirkung auf die Arbeit des Ferments untersucht werden sollte, aufgefüllt. Von diesen Proben wurden 10 ccm Flüssigkeit für die Bestimmung von p_H nach *Sörensen* entnommen. Zu den restlichen 40 ccm der Probe wurden 5 ccm einer frisch bereiteten, filtrierten 10proz. Pyrogallollösung (*Kahlbaum*) und 5 ccm 1proz. Wasserstoffsuperoxydlösung zugefügt (Wasserstoffsuperoxyd wurde aus Perhydrol von *Merck* bereitet und bis p_H 6,8 neutralisiert). Die Bestimmung von ($H^{\cdot}$) im gesamten Reaktionsgemisch konnte weder mit Hilfe der kolorimetrischen Methode noch elektrometrisch ausgeführt werden, da sich die Flüssigkeit sofort zu färben beginnt und die Farbe dabei fortwährend wechselt; diese Erscheinung macht eine kolorimetrische Bestimmung unmöglich. Die elektrometrische Methode konnte deshalb nicht angewandt werden, weil die Reaktion zwischen Pyrogallol und dem Chinon der Chinhydronelektrode äußerst heftig verläuft; dabei wird das Chinon unter Abscheidung von Purpurogallin zu Hydrochinon reduziert. Aus diesen Gründen beschränkten wir uns auf eine kolorimetrische Bestimmung von ($H^{\cdot}$) im Reaktionsgemisch, in dem einmal H_2O_2 und das andere Mal das Pyrogallol ausgeschaltet war. In beiden Fällen zeigte sich, daß die Zufügung dieser Stoffe die Wasserstoffionenkonzentration unseres Auszuges nicht veränderte.

Das Reaktionsgemisch wurde ungefähr 20 Stunden bei einer Temperatur von 26° C stehengelassen. Nach dieser Zeit wurden alle Portionen durch Zufügen von 1 ccm n/10 HCl inaktiviert. Sodann wurden die Kölbchen mit der Flüssigkeit in Schnee oder kaltem Wasser abgekühlt und das Purpurogallin mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt; bei dieser Operation bedienten wir uns eines Asbestfilters, das in einen Goochtiegel eingelegt wurde. Der Niederschlag wurde so lange mit *kaltem* Wasser ausgewaschen, bis das Filtrat auf organische Stoffe keine Reaktion mehr aufwies (Probe mit schwacher Chamäleonlösung). Das ausgewaschene Purpurogallin wurde auf dem Filter in starker Schwefelsäure gelöst, dann wurde die Lösung mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 8 verdünnt. Die saure Purpurogallinlösung wurde darauf mit n/10 Chamäleon unter Erwärmen oxydiert. Chamäleon wurde stets im Überschuß zugegeben, um eine vollständige Oxydation zu bewirken. Nach Verlauf von 40 bis 50 Minuten titrierten wir den Überschuß von Permanganat mit n/10 Oxalsäure zurück. Die Mengendifferenz von $KMnO_4$, das für die aktive und inaktivierte (durch Erwärmen auf einem siedenden Wasserbade) Probe verbraucht wurde, in Kubikzentimetern ausgedrückt, ergab somit die Menge des abgeschiedenen Purpurogallins und zeigte auf diese Weise die Oxydations-

energie der Peroxydase[1]) an. Drücken wir die Peroxydasewirkung bei Verwendung verschiedener Salzlösungen in Prozenten zur Wirkung derselben bei Abwesenheit von Salzen aus, so erhalten wir einen Ausdruck für *die relative Aktivität des Ferments*. In unserer ersten Mitteilung haben wir hervorgehoben, daß die Neutralsalze der bivalenten Metalle hauptsächlich eine Ansäuerung des Gemisches hervorrufen. Darum stellten wir vor den Versuchen über die Wirkung der Salze eine Versuchsreihe über die Wirkung einer Änderung der Wasserstoffionenkonzentration auf die Peroxydasearbeit in unserem Auszuge an.

1. Versuchsreihe. Der Einfluß von p_H auf die Aktivität der Peroxydase. Die ungünstige Wirkung einer gesteigerten Wasserstoffionenkonzentration auf die Aktivität von *Peroxydase* wurde außer von *Bertrand*[2]) auch von *S. Kostytschew*[3]) im Jahre 1910 beobachtet; dieselbe schädliche Wirkung einer Ansäuerung des Mediums wurde später auch von *Willstätter* und *Stoll* festgestellt[4]). Letztere beobachteten, daß eine Sättigung des Reaktionsgemisches mit Kohlensäure die Menge des ausgeschiedenen Purpurogallins zur Hälfte herabsetzt. Es blieb aber bis heute unerforscht, in welchen Konzentrationsgrenzen von [H˙] eine Arbeit der Peroxydase möglich ist. Die Veränderung der Reaktion unseres Gemisches wurde durch Zufügen einer n/100 Lösung von Na_2CO_3 oder HCl zum Wasserauszug aus gemahlenen Weizensamen vorgenommen. Zu 25 ccm des Auszuges wurde eine bestimmte Anzahl Kubikzentimeter einer Lösung von Na_2CO_3 oder HCl zugegeben und das Gesamtvolumen darauf bis zu 50 ccm mit destilliertem Wasser ergänzt. Eine aktive Portion des Gemisches, die zur Kontrolle verwandt wurde, bereiteten wir aus 25 ccm des Auszuges und 25 ccm destillierten Wassers.

Jede dieser beiden Portionen wurde mit einer inaktivierten Kontrollportion verglichen. Von allen diesen Portionen wurden je 10 ccm des Gemisches zur Bestimmung von p_H entnommen. Zu den übriggebliebenen 40 ccm wurden Pyrogallol und H_2O_2 in den oben angeführten Mengenverhältnissen zugesetzt. Die Kölbchen mit den Reaktiongemischen ließen wir im Thermostaten bei etwa 26° C während 20 Stunden stehen.

Tabelle 1.

p_H	3,5	4,0	4,98	**6,5**	7,1	7,5
Relative Aktivität v. Peroxydase	1,9	2,84	55,79	**100**	135,0	148,16

p_H	7,86	8,3	8,7	9,3	9,5
Relative Aktivität v. Peroxydase	150,53	175,07	183,64	173,86	139,68

Graphisch sind diese Verhältnisse in der Abb. 1 wiedergegeben; es sind auf der Abszissenachse die Werte von p_H und auf der Ordinatenachse die relative Aktivität des Ferments vermerkt.

[1]) 1 ccm n/10 $KMnO_4$ entspricht 0,7 mg Purpurogallins. Gewichtsmengen des Purpurogallins 76,4 und 74,0 mg. Mengen von n/10 $KMnO_4$ 107,55 und 106,8 ccm.

[2]) *G. Bertrand* et Mlle. *M. Rosenband*, Ann. de l'Inst. Pasteur **23**, 314, 1909.

[3]) *S. Kostytschew*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**, 116, 1910.

[4]) *Willstätter* und *Stoll*, Liebigs Ann. d. Chem. **416**, H. 1, S. 50, 1918.

Wir sehen also, daß eine ganz bestimmte Abhängigkeit des Oxydationspotentials des Systems *Peroxydase* + *Peroxyd* von der Konzentration [H˙] besteht. Der Kurvenverlauf erinnert an die Verhältnisse bei der Katalase[1]). Das Maximum der Peroxydasewirkung liegt in der Nähe von p_H 8,7, bei zunehmender Alkalität fängt die Aktivität des Ferments rasch abzunehmen an[2]). Bei dieser Reaktion des Substrats findet eine Autoxydation des Pyrogallols ohne Einwirkung der Peroxydase statt. Wir konnten dies daran erkennen, daß die inaktivierten Lösungen sofort nach der Zugabe von Pyrogallol und H_2O_2 anfingen, sich dunkel zu färben; außerdem zeigten diese Proben, nachdem sie eine Zeitlang im Thermostaten gestanden hatten, einen kleinen Niederschlag von Purpurogallin. Ein derartiges Verhalten zeigen die inaktivierten Portionen sonst nicht. Bei der Titration dieser inaktivierten Portionen muß daher mehr Chamäleon als gewöhnlich verbraucht werden. So braucht man für die Titration einer Probe mit p_H 6,5 0,55 ccm von n/10 $KMnO_4$, bei einer solchen mit p_H 9,3 bis 0,93 ccm und bei der Titration einer Probe mit p_H 9,5 sogar bis 2,2 ccm. Allein ungeachtet dieser für die Oxydation des Pyrogallols günstigen Bedingungen

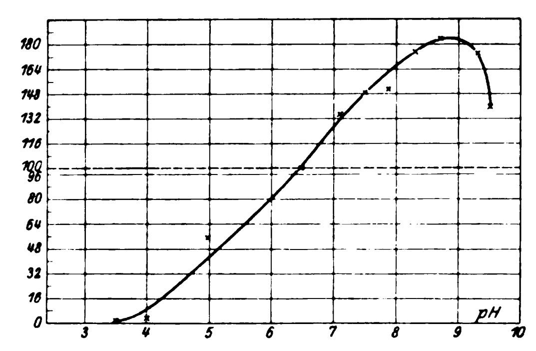


Abb. 1. Abhängigkeit der Peroxydasewirksamkeit von der Wasserstoffionenkonzentration.

fangen die Ausbeuten an Purpurogallin in den aktiven Portionen mit zunehmender Alkalität doch an, kleiner zu werden; das zeigt, daß hier die Bedingungen für die Arbeit des Ferments ungünstig sind. *Also wächst das Oxydationspotential des Systems Peroxydase + Peroxyd bei zunehmender Alkalität nicht unbeschränkt, es ist vielmehr eine bestimmte Grenze der Alkalität gegeben, bei deren Überschreitung das Potential wieder zu sinken anfängt.* Hier liegt ein wesentlicher Unterschied zwischen der Oxydation durch die Einwirkung von Fermenten und der Oxydation mit Hilfe der Eisensalze[3]) vor. Die Peroxydase arbeitet wie jedes typische Ferment nur innerhalb bestimmter Intervalle von [H˙]. Es ist hier vielleicht bemerkenswert, daß nach den Arbeiten von *Willstätter* und *Stoll* noch ein wesentlicher Unterschied der Peroxydase von den anorganischen Katalysatoren (Induktoren

[1]) *Smirnow* und *Alissowa*, l. c.

[2]) Das Wirkungsoptimum der Peroxydase auf HJ liegt nach *Abel* bei p_H 4,5 (nach *C. Oppenheimer*, Die Fermente, Lief. 1, S. 369, 1924).

[3]) *Wolf* et *E. de Stoecklin*, l. c.; *Bach*, Der Chemismus der Atmungsprozesse. Journ. f. Russ. Physik.-Chem. Gesellsch. 44, II, 1, 1912; *Andre*, Chemie Végétale 1, 1924.

nach der Terminologie von *Luther* und *Schilow*) vom Typus der Eisenoxydsalze festgestellt worden ist. *Willstätter* und *Stoll*[1]) zeigten, daß die Peroxydase beim Oxydationsprozeß nicht verbraucht wird, wenn als Sauerstoffquelle eine nicht zu große Menge von H_2O_2 genommen wird. Wird aber zur Oxydation Eisenoxydulsalz angewandt, so wird dieses im Laufe des Oxydationsprozesses verbraucht. (Früher nahm man an, daß auch bei der Oxydation mit Peroxydase dieselbe verbraucht wird.) Hieraus geht hervor, daß die Einwirkung von Peroxydase nicht mit der Einwirkung von Eisenoxydulsalzen verglichen werden kann. Daher muß die Peroxydase als typischer Fermentkatalysator betrachtet werden und darf nicht als ein Induktor in gekoppelten Reaktionen vom Typus der Eisenoxydulsalze aufgefaßt werden; ein prinzipieller Unterschied zwischen beiden Typen der Katalyse liegt aber nicht vor[2]).

2. Versuchsreihe. Einfluß von n/20 Chloridlösungen auf die Aktivität der Peroxydase in einem Auszug aus Weizensamen. Isolierte Präparate von Peroxydase (und solche der vollen Oxydasen) enthalten gewöhnlich, trotz sorgfältigster Reinigung, gewisse Mengen von Asche, welche hauptsächlich aus Salzen der Erdalkalien besteht[3]). Hieraus ergibt sich die Frage über die Rolle der Aschenbestandteile bei der Entstehung und bei der Arbeit der Oxydationsfermente. *A. Bach* erklärt die positive Wirkung einiger Mineralsalze auf die Steigerung der Oxydationsenergie bei den Prozessen langsamer Verbrennung dadurch, daß die Salze „mit den Peroxyden, die bei langsamer Verbrennung leicht oxydierbarer Körper entstehen, labile Komplexe bilden, welche ihren aktiven Sauerstoff leichter und schneller als die anfänglich gebildeten Peroxyde abgeben können". An einer anderen Stelle derselben Mitteilung wird berichtet: „Für die anfängliche Wirkung von Oxydasen, d. h. für die Anlagerung des molekularen Sauerstoffs werden die Mineralsalze nicht gebraucht. Dieselben treten erst in Aktion, nachdem der Sauerstoff sich mit der Oxydase verknüpft hat, und bilden dann Peroxydkomplexe. Die Metallsalze beschleunigen die Oxydationswirkung und spielen somit die Rolle sekundärer Katalysatoren der langsamen Verbrennung". Ein derartiger Schluß wird auf Grund der von *Melichow* und *Pissarjewsky* beobachteten Bildungen von labilen Verbindungen des Wasserstoffsuperoxyds mit salzähnlichen Derivaten gezogen. Auf Grund einer solchen Beurteilung müssen die Salze die Peroxydase in gewissem Grade ersetzen[4]). Daher muß der Zuwachs des Oxydationspotentials vom System *Peroxydase* + H_2O_2, welcher bei Anwesenheit von Salzen beobachtet wird, gleich der Oxydationswirkung des *Wasserstoffsuperoxyds* + *Salze* ohne Peroxydase sein, d. h. gleich der Oxydationswirkung von Wasserstoffsuperoxyd + Salze in inaktivierten Portionen. Eine ganz entgegengesetzte Vorstellung über die Ursache der Salzwirkung gewinnt man aus der von *Willstätter* und *Stoll*[5]) geäußerten Ansicht. Nach dieser „bewirkt ein Gehalt an Erdalkaliverbindungen, daß die Per-

[1]) *Willstätter* und *Stoll*, l. c., S. 40ff.

[2]) *A. Bach*, Journ. f. Russ. Physik.-Chem. Gesellsch. **44**, II, 2, 1912; *W. Ipatiew*, ebendaselbst, S. 1675.

[3]) *Euler* und *Bolin*, Zeitschr. f. physik. Chem. **69**, 187, 1909; *A. Bach* und *Tscherniak*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **41**, 2345, 1908.; *Willstätter* und *Stoll*, l. c.

[4]) *A. Bach*, Ber. d. chem. Ges. **43**, 364, 1910.

[5]) *Willstätter* und *Stoll*, l. c., S. 52.

oxydasepräparate eine geringe oxydaseähnliche Wirkung zeigen, daß sich nämlich Pyrogallollösung mit Peroxydase ohne Hydroperoxyd bei Zutritt von Luftsauerstoff langsam bräunt". Stellen wir uns auf diesen Standpunkt, so müssen wir im Gegensatz zur Auffassung *Bachs* über die Rolle der Salze bei Oxydationsprozessen annehmen, daß der positive Effekt bei der Zugabe von Erdalkalisalzen durch die Teilnahme derselben zusammen mit O_2 an der Bildung von primären Peroxyden erklärt wird. Teilen wir diese Auffassung von *Willstätter* und *Stoll*, so müssen wir erwarten, daß der Unterschied zwischen der Wirkung des Systems *Peroxydase* + H_2O_2 bei der Zugabe von Erdalkalisalzen und ohne solche Zugabe gleich der Oxydationswirkung der Peroxydase ist, der an Stelle von Peroxyd die gleiche (wie im ersten Falle) Menge an Erdalkalisalzen zugefügt wird.

Die Lösungen der Chloride wurden aus chemisch reinen Präparaten von *Kahlbaum* hergestellt. Der Titer wurde mit Hilfe von n/10 $AgNO_3$ festgestellt. Zuerst wurden stärkere Lösungen bereitet; in diesen wurde die Konzentration [H˙] ermittelt. Im Fall einer Abweichung von der Konzentration [H˙] des Fermentauszuges wurde die Konzentration der Salzlösung mit derjenigen des Fermentauszuges durch Zufügen der entsprechenden Menge an Lauge oder Säure ausgeglichen. Nach dieser Operation wurden die Salze mittels $AgNO_3$ auf n/10 Konzentration eingestellt und für die Versuche verwendet. Die Resultate der Versuche mit n/10 Salzen sind in der Tabelle II angeführt. Die Salzkonzentration des Reaktionsgemisches war in dieser Versuchsserie gleich n/20, denn die Salzlösungen wurden mit gleichen Volumina des Auszuges vermischt.

Tabelle II.

n/20 Lösungen:	NH_4Cl	LiCl	NaCl	KCl	RbCl
Relative Aktivität v. Peroxydase	96,34	128,09	52,81	71,77	79,52
p_H der Salzportion	6,7	6,65	6,7	6,64	6,64
p_H d. salzfreien Portion (Kontrolle)	6,7	6,6	6,6	6,55	6,55

n/20 Lösungen:	$MgCl_2$	$CaCl_2$	$ZnCl_2$	$SrCl_2$	$BaCl_2$	$MnCl_2$
Relative Aktivität v. Peroxydase	144,59	140,44	0	141,12	119,08	102,25
p_H der Salzportion	6,4	6,4	6,0	6,6	6,6	6,2
p_H d. salzfreien Portion (Kontrolle)	6,6	6,4	6,7	6,6	6,7	6,7

Die beiden letzten horizontalen Reihen der Tabelle II stellen die Größe des negativen Logarithmus der Konzentration [H˙] dar, wobei die erste Zahlenreihe den Portionen mit Zugabe von Salzen entspricht; die Zahlen der zweiten Reihe zeigen die Reaktion der Kontrollportionen ohne Zugabe von Salzen. Vergleicht man die beiden Reihen miteinander, so sieht man, daß die Änderung von p_H infolge der Zugabe von Salzen nur unbedeutend war. Die Chloride der Alkalimetalle bewirken eine Verschiebung der Reaktion der Lösung im Sinne zunehmender Alkalität, d. h. sie begünstigen das Substrat für die Peroxydasearbeit. Die Chloride der Erdalkalien verschieben die Reaktion des Substrats umgekehrt im Sinne einer Ansäuerung, und zwar ist die Veränderung hier eine viel größere als es im entgegengesetzten Sinne für Alkalichloride der Fall war. Also beeinflussen die Chloridsalze der Erdalkalien die Reaktion des Substrats für die Peroxydasearbeit weniger günstig. Am stärksten ist die Ansäuerung, die $ZnCl_2$ verursacht. Was die Änderung der Aktivität des Ferments betrifft,

so muß zuerst hervorgehoben werden, daß diese in der Mehrzahl der Fälle nicht mit der Änderung von p_H übereinstimmt. Nur bei $ZnCl_2$ konnte man eine solche Übereinstimmung konstatieren, doch ist auch hier diese Übereinstimmung nur eine teilweise, denn sie genügt nicht, um den vollen Effekt zu erklären. Zweitens konnten wir feststellen, daß die Chloride nach ihrer Wirkung auf die Arbeit der Peroxydase in zwei Gruppen eingeteilt werden müssen. Die erste besteht aus den Chloriden der Alkalien, welche im allgemeinen auf die Arbeit der Peroxydase (außer LiCl, das in der angewandten Konzentration einen stimulierenden Einfluß ausübte) einen hemmenden Einfluß ausüben. Die zweite Gruppe, die aus den Chloriden der bivalenten Metalle besteht, übte, außer $ZnCl_2$, eine positive Wirkung auf die Peroxydasearbeit aus. Die positive Wirkung der zweiten Gruppe war etwas stärker als die negative Wirkung der ersten. Die Chloride der bivalenten Metalle übten auf die Peroxydasearbeit eine gerade entgegengesetzte Wirkung aus, als für Katalase beobachtet worden war[1]). Dadurch wird noch einmal der physiologische Antagonismus, der zwischen den beiden Fermenten besteht, bestätigt; wir beobachten hier denselben Unterschied im Verhalten der beiden Fermente, wie das auch in ihrem Verhalten zum Licht zutage tritt[2]). Die hemmende Wirkung von NaCl, KCl, RbCl war dem Atomgewicht der Metalle umgekehrt proportional. Das eigenartige Verhalten von LiCl findet eine Erklärung in den besonderen Eigenschaften dieses Metalls im Vergleich mit anderen Metallen der Alkaligruppe[3]). NH_4Cl nimmt eine Grenzstellung zwischen der positiven Einwirkung von LiCl und der negativen Einwirkung der übrigen Alkalichloride ein. In der Gruppe der Erdalkalien üben $MgCl_2$, $CaCl_2$ und $SrCl_2$ in einer Konzentration von n/20 eine gleiche positive Wirkung auf die Erhöhung des Oxydationspotentials des Systems *Peroxydase* + H_2O_2 aus. $BaCl_2$ übte eine zweimal schwächere Wirkung aus. Das Verhalten von $ZnCl_2$ wich schon vom Moment der Bereitung der Reaktionsgemische vom Verhalten der anderen Chloride derselben Gruppe ab. Bereits bei der Vermischung der Lösung von $ZnCl_2$ mit dem Auszug trat eine Opaleszenz des Gemisches auf, die in anderen Fällen nicht beobachtet wurde, dabei wurde das Reaktionsgemisch stark sauer. Dieser Vorgang scheint nicht nur mit der hydrolytischen Spaltung des Salzes verbunden zu sein, sondern auch damit zusammenzuhängen, daß beim Hinzufügen des Salzes die Phosphatpufferverbindungen und die Eiweißpuffer aus der Lösung ausgeschaltet werden[4]). Ferner wurde auch beobachtet, daß die Portionen, denen $ZnCl_2$ und $MnCl_2$ beigegeben wurden, gleich nach dem Zusatz der Salze eine stärkere Bräunung des Gemisches aufwiesen, was bei den Kontrollportionen ohne Salze nicht der Fall war. Man könnte in einem solchen Verhalten ein Zeichen dafür erblicken, daß die Peroxydasearbeit in Gegenwart dieser Salze begünstigt wird, wenn nicht in den gekochten Portionen mit denselben Salzen eine ganz analoge Verstärkung der Färbung eintrat.

Nachdem die Kölbchen mit $ZnCl_2$ die übliche Zeit im Thermostaten gestanden hatten, hatte der ausgeschiedene Niederschlag nicht das für Purpurogallin charakteristische Aussehen eines feinkristallinischen rotbraunen Pulvers angenommen; der gebildete Niederschlag war flockenartig,

[1]) Diese Zeitschr. **149**, 63, 1924.
[2]) *C. Oppenheimer*, l. c.
[3]) *O. Baudisch*, diese Zeitschr. **106**, 134, 1920.
[4]) Siehe Mitteilung I.

dunkelbraun und war in den aktiven und inaktivierten Portionen fast gleich. $MnCl_2$ verursachte auch einen Niederschlag in der inaktivierten Portion. Bei der Filtration der Portion mit $ZnCl_2$ blieb auf dem Filter ein schwarzer Niederschlag, der beim Auswaschen mit kaltem Wasser aufgelöst wurde; auf dem Filter blieb hernach ein schwacher Niederschlag, der schwach orange gefärbt war und sich restlos in 5 ccm starker H_2SO_4 unter schwacher Färbung löste. Die Menge von $KMnO_4$, die für die inaktivierte Portion gebraucht wurde, war sogar etwas größer (um 0,35 ccm) als für die aktive[1]). Die inaktivierte Portion mit $MnCl_2$ forderte auch eine zweimal größere Menge von $KMnO_4$ als die inaktivierte Portion ohne Zugabe von Salz; doch war die Menge des verbrauchten $KMnO_4$ bei der inaktivierten Portion + $MnCl_2$ unvergleichbar kleiner als bei der aktiven Portion mit Zugabe von $MnCl_2$ (im Mittel wurde für zwei aktive Portionen — 22,7 ccm n/10 $KMnO_4$ — und für zwei inaktivierte 1,0 ccm $KMnO_4$ gebraucht). Vergleicht man den Verbrauch von Chamäleon bei den inaktivierten Portionen, so sieht man, daß die inaktivierte Portion mit $MnCl_2$ zweimal mehr, und die inaktivierte Portion mit $ZnCl_2$ dreimal mehr $KMnO_4$ forderte als die inaktivierte Kontrollportion ohne Zusatz von Salzen; Kontrollportion 0,5 ccm, $MnCl_2$ 1,0 ccm; $ZnCl_2$ 1,65 ccm. Wenn es zulässig ist, von einer Bildung solcher sekundärer Peroxyde durch Salze zu sprechen, die einigermaßen die Peroxydase zu ersetzen vermögen, so kann sich das in unseren Versuchen nur auf $MnCl_2$ und $ZnCl_2$ beziehen; nur diese Salze haben einen kleinen Effekt in den inaktivierten Portionen hervorgerufen, doch rief der Zusatz von Salzen keine Erhöhung des Oxydationspotentials in den aktiven Portionen hervor. Im Gegenteil verursachte $ZnCl_2$, welches eine ausgesprochene Steigerung des Oxydationspotentials des Hydroperoxyds in Abwesenheit von Peroxydase hervorrief, keine Vergrößerung der Aktivität der Peroxydase, sondern hemmte die Wirkung der letzteren völlig. Außer dem gesteigerten Verbrauch von $KMnO_4$ konnte man feststellen, daß die inaktivierten Portionen mit $MnCl_2$ und $ZnCl_2$ eine intensivere Färbung der Filtrate hervorriefen als die inaktivierten Kontrollportionen ohne Salze. Bei Zn war die Färbung nach der kolorimetrischen Bestimmung 3,5 mal stärker, bei Mn 1,7 mal stärker als in den Kontrollportionen ohne Salze. Die Intensität der Färbung konnte nicht nur von einer energischeren Oxydation abhängen, sondern auch von der Reaktion der Lösung beeinflußt werden; solche Salze wie $ZnCl_2$ und $MnCl_2$ rufen eine merkliche Ansäuerung des Substrats hervor; wir haben aber oben schon erwähnt, daß ein Zusatz von Säure die schwache Färbung der Pyrogallollösung verstärkt. Auch in Abwesenheit eines natürlichen Substrats wird das Gemisch von Pyrogallol mit H_2O_2 in Gegenwart von $ZnCl_2$ und $MnCl_2$ schneller gelb gefärbt als ohne diese Salze. Bei allen anderen Salzen, auch die Chloride der Erdalkalien eingeschlossen, zeigten die inaktivierten Portionen stets dasselbe Verhalten wie die Kontrollportionen ohne Salze (gleiche Mengen von $KMnO_4$ und eine blaßgelbe Farbe des Filtrats).

Wir sehen also aus den Ergebnissen dieser Versuchsreihe, daß die stimulierende Wirkung der Erdalkalisalze nicht durch Bildung sekundärer Peroxyde erklärt werden kann, weil bei der Inaktivierung der Peroxydase die Salze keinen positiven Effekt hervorzurufen vermögen. Würde die fördernde Wirkung der Erdalkalisalze auf der Eigenschaft, daß ihre Kationen

[1]) Hydrolytische Oxydation durch $Zn(OH)_2$ ohne Einwirkung von Peroxydase.

der Peroxydase den Charakter einer vollständigen Oxydase zu geben vermögen, beruhen [wie dieses *Willstätter* und *Stoll*[1]) annehmen], so mußte dieses folgendermaßen zum Ausdruck kommen. Der Oxydationseffekt müßte in Abwesenheit von Peroxyd aber in Gegenwart von Erdalkalisalzen dem Zuwachs der Oxydationsarbeit des aktiven Auszuges + H_2O_2 bei Zugabe von Erdalkalien gleichkommen. Wir haben einen Versuch in Abwesenheit von H_2O_2 unter Innehaltung aller anderen früheren Bedingungen unternommen. Es stellte sich heraus, daß die Chloride der Erdalkalien bei Abwesenheit von H_2O_2 nicht nur keine Verstärkung der Oxydation hervorriefen, sondern im Gegenteil eine Hemmung derselben bewirkten, wenn man nach der Intensität der Färbung über die Oxydationswirkung urteilen wollte. In keiner Portion mit oder ohne Zusatz von Salzen wurde ein Niederschlag von Purpurogallin gebildet. Nach dem Zuwachs von Purpurogallin, welcher durch den Zusatz von Erdalkalichloriden zum System *Peroxydase* + H_2O_2 entstand, zu urteilen, konnte man erwarten, daß, wenn die gestellte Voraussetzung richtig ist, auch bei Ausschaltung von H_2O_2 die Erdalkalisalze eine Bildung von Purpurogallin in wägbaren Mengen hervorrufen werden. Da aber kein Niederschlag gebildet wurde, so mußte die Bestimmung der Intensität der Oxydation kolorimetrisch vorgenommen werden; beim Vergleich wurde die Intensität der Farbe der inaktivierten Portion ohne Salze gleich 1 gesetzt. Wir erhielten folgende Resultate, die in Tabelle III wiedergegeben sind.

Tabelle III.

n/20 Lösungen:	Ohne Salze	NaCl	KCl	$MgCl_2$	$CaCl_2$
Relative Intensität der Färbung	2,31	2,416	1,793	0,984	0,799
Intensität in Proz. zur Kontrollportion ohne Salze	100	104,7	77,6	42,6	34,6
p_H	6,7	6,75	6,7	6,55	6,5

In Abwesenheit von H_2O_2 bewirkten die Erdalkalisalze nicht nur keine Verstärkung der Lösungsfarbe, sondern schwächten sie sogar ab.

Wir sehen also, daß die von uns gewonnenen Resultate nicht mit den Auffassungen von *Bach* und *Willstätter* über die Wirkung der Erdalkalisalze in Einklang zu bringen sind. Die Erhöhung des Oxydationspotentials vom System *Peroxydase* + H_2O_2 durch Zusatz von Erdalkalisalzen, kann weder durch Bildung von sekundären Peroxyden, die ähnlich wie Peroxydase zu wirken vermögen, noch durch ihre Eigenschaft, als primäre Peroxyde zu fungieren oder die Bildung solcher Peroxyde zu fördern (d. h. Oxygenase zu ersetzen oder zu aktivieren) erklärt werden.

Es blieb nur noch die Annahme übrig, die Bildung von Komplexverbindungen der Salze mit dem Substrat nachzuprüfen. Wir haben schon erwähnt, daß in den Arbeiten von *Bach* und *Marianowitsch*[2]) ein und dasselbe Salz bei der Oxydation der Phenole mittels einer Phenolase aus *Lactarius velereus* eine verschiedene Wirkung auslöste; einige von den Substraten wurden in Anwesenheit desselben Salzes schneller oder langsamer oxydiert. Die Verfasser erklärten diese Erscheinung dadurch, daß die Salze mit den Substraten Komplexverbindungen bilden, die mit einer anderen Geschwin-

[1]) l. c.
[2]) l. c.

digkeit als das Ausgangssubstrat oxydiert werden[1]). Um zu prüfen, in welchem Maße diese Ursache in unseren Versuchen mitspielte, unternahmen wir einen Versuch mit denselben Salzen und dem System $Fe^{\cdot\cdot} + H_2O_2$. Bildet das Pyrogallol mit Salzen wirklich Komplexverbindungen, die durch das System *Peroxydase* + H_2O_2 anders als Pyrogallol oxydiert werden, so sind wir berechtigt, zu erwarten, daß dieselbe Wirkung der Salze auf die Oxydation von Pyrogallol auch in Anwesenheit eines anderen Katalysators als Peroxydase, in unserem Falle von Eisenoxydul, bestehen bleibt.

Kolorimetrische Berechnung der Oxydationsintensität von Pyrogallol durch das System $Fe^{\cdot\cdot} + H_2O_2$ *und die Abhängigkeit derselben von der Anwesenheit von Chloriden: Li, Na, K, Mg, Ca, Zn, Sr, Ba und Mn. Kontrollportion*: 40 ccm destilliertes Wasser, 6 ccm 2proz. frisch bereiteter und filtrierter Lösung von Pyrogallol, 5 ccm 1proz. Hydroperoxydlösung und 1 ccm 0,01proz. Lösung von $FeCl_2$. *Versuchsportionen*: 20 ccm destilliertes Wasser, 20 ccm n/10 Chloridlösung, 6 ccm 2proz. Pyrogallol, 5 ccm 1proz. Lösung von H_2O_2 und 1 ccm 0,01proz. Lösung von $FeCl_2$.

Nach einem Zusatz von 1 ccm einer 0,01proz. Lösung von $FeCl_2$ färbte sich die Flüssigkeit nur sehr langsam; darum fügten wir noch je 2 Tropfen 0,1proz. Lösung von $FeCl_2$ zu jeder Portion hinzu. Nach Verlauf von 1½ Stunden, während deren die Lösungen bei Zimmertemperatur gestanden hatten und einen vergleichbaren rotbraunen Ton angenommen hatten, wurde eine kolorimetrische Bestimmung der Intensität ihrer Farbe vorgenommen. Vor der Bestimmung wurden zu jeder Portion 50 ccm destillierten Wassers zugegeben. Die Intensität der Färbung der Kontrollportion wurde gleich 100 angenommen. Wir erhielten folgende Reihe:

Ohne Salze	LiCl	NaCl	KCl	$MgCl_2$	$CaCl_2$	$ZnCl_2$	$SrCl_2$	$BaCl_2$	$MnCl_2$
100	84	54	65	77	62	74	51	50	71

Vergleicht man diese Reihe mit den entsprechenden Zahlen der Tabelle II, so kann man sehen, daß nur für NaCl und KCl die Wirkung des Systems $Fe^{\cdot\cdot} + H_2O_2$ und des Systems *Peroxydase* + H_2O_2 auf die Veränderung des Oxydationspotentials eine gleiche war, darum wird die Annahme sehr wahrscheinlich, daß die Wirkung der Salze auf der Bildung von Verbindungen zwischen diesen Salzen und dem Substrat beruht, welche schwerer der Oxydation unterliegen als das Substrat für sich allein. Was andere Salze und speziell die Erdalkalichloride anbetrifft, so kann ihre Einwirkung auf die Veränderung des Oxydationspotentials nicht durch die oben angeführte Ursache erklärt werden. Hier scheint die Ursache in einem Zusammenwirken der Salze mit dem Ferment selbst zu liegen. Welcher Art diese Wirkung ist, kann gegenwärtig nicht entschieden werden; man kann nur mehr oder weniger plausible Annahmen machen. Speziell über die Erdalkalien, die immer in den Präparaten der Peroxydase vorkommen, kann angenommen werden, daß dieselben die Rolle der Kinasen übernehmen, indem sie das Zymogen der Peroxydase in eine aktive Form des Ferments überführen. Eine solche Rolle der Erdalkalien und speziell des Ca wurde mehrmals für andere Fermente gefunden[2]). Außerdem

[1]) Eine leichtere Oxydation vom Substrat, das Komplexverbindungen mit Salzen bildet, wird chemisch auch durch spätere Beobachtungen bestätigt. *O. Baudisch*, diese Zeitschr. **106**, 134, 1920.

[2]) *H. Euler*, Chemie der Enzyme **1**, 146, 1920.

können die Erdalkalisalze indirekt die Arbeit der Peroxydase begünstigen, indem sie ihren physiologischen Antagonisten, die Katalase, hemmen[1]); es ist bekannt, daß in Gegenwart von Katalase unter der Einwirkung von H_2O_2 eine Zerstörung der Peroxydase stattfinden kann[2]). Solch eine Möglichkeit besteht aber nicht für $MnCl_2$, denn dieses Salz übte auf die Katalase eine ausgesprochen hemmende Wirkung aus[3]), für Peroxydase aber erwies sich dieses Salz als indifferent. Die absolute Hemmung der Peroxydase durch Zink beruht unzweifelhaft auf der Adsorption des Ferments durch die Koagulation der Kolloide des Auszuges einerseits, andererseits aber auf der Ansäuerung des Substrats, d. h. auf der summaren Wirkung mindestens zweier Faktoren.

3. Versuchsreihe. Einwirkung von Chloriden in einer Konzentration von n/800 auf die Aktivität der Peroxydase. In einer lebenden Zelle kann man schwer solche Konzentrationen wie n/20 erwarten. Darum schien es von Interesse, zu verfolgen, wie die Salze die Arbeit des Ferments beeinflussen werden bei einer Verdünnung bis zu kleinsten Konzentrationen. Aus einer ganzen Serie von Konzentrationen, die wir untersucht haben, wollen wir hier die Versuchsreihe wiedergeben, bei der wir den größten positiven Effekt beobachtet haben. Als Ausgangslösung für unsere Versuche brauchten wir dieselben n/10 Lösungen der Salze, die wir für unsere früheren Versuche verwendet hatten. Diese Lösungen wurden in der gegebenen Serie von Versuchen mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 40 verdünnt. Die so erhaltenen n/400 Lösungen wurden mit gleichen Mengen des Samenauszuges vermischt. Alle Bedingungen, außer den Salzkonzentrationen, waren die früheren. Die Resultate sind in Tabelle IV zusammengestellt:

Tabelle IV.

n/800 Lösungen:	NH_4Cl	LiCl	NaCl	KCl	RbCl
Relative Aktivität v. Peroxydase	90,7	97,83	92,75	96,3	85,64
p_H der Salzportionen	6,5	6,55	6,7	6,6	6,55
p_H der Kontrollportion (ohne Salze)	6,5	6,5	6,7	6,5	6,55

n/800 Lösungen:	$MgCl_2$	$CaCl_2$	$ZnCl_2$	$SrCl_2$	$BaCl_2$	$MnCl_2$
Relative Aktivität v. Peroxydase	94,3	143,0	24,02	153,5	165,2	72,16
p_H der Salzportionen	6,50	6,6	6,2	6,5	6,5	6,5
p_H der Kontrollportion (ohne Salze)	6,55	6,5	6,55	6,5	6,5	6,55

Zunächst muß bemerkt werden, daß die Verschiebung der Reaktion (p_H), welche bei einigen Salzen beobachtet wurde, hier nicht mehr beobachtet wird. So geben Mg und Mn keine Verschiebung mehr; Zn gibt eine viel kleinere Verschiebung. Die Aktivität der Peroxydase wurde im Vergleich zu höheren Konzentrationen so verändert, daß bei einigen Salzen eine Verstärkung der Peroxydasewirkung, bei anderen hingegen eine schwächere Wirkung als bei entsprechenden Salzlösungen von höherer Konzentration festgestellt wurde. So konnte man eine Schwächung der hemmenden

[1]) *A. Smirnow* und *S. Ph. Alissowa*, diese Zeitschr. **149**, 63, 1924.
[2]) *C. Oppenheimer*, Die Fermente **2**, 1913.
[3]) *W. Farre*, diese Zeitschr. **33**, 32, 1911; *Smirnow* und *Alissowa*, l. c.

Wirkung der Alkalimetalle außer NH_4Cl konstatieren. LiCl büßte in einer Konzentration n/800 seine positive Wirkung ein und zeigte fast die gleiche Wirkung wie die Kontrollportion ohne Salz. In der Erdalkaligruppe übten die Salze von Ca, Sr und Ba einen positiven Effekt auf die Wirkung von Peroxydase aus, wobei Ca in der Konzentration n/800 dieselbe Wirkung ausübte, wie bei der früher untersuchten Konzentration n/20; Sr und Ba verstärkten bei der Konzentration n/800 ihre Wirkung. Mg, welches einige chemische Eigentümlichkeiten im Vergleich zu anderen Erdalkalimetallen aufweist, verhielt sich in dieser Verdünnung wie Li und büßte hier seine stimulierende Wirkung ein; es übte sogar einen hemmenden Einfluß auf die Peroxydase aus und zeichnete sich nach seiner biochemischen Wirkung auch vor anderen Metallen der Erdalkaligruppe aus. Bei starker Verdünnung übten die Metalle Mg, Ca, Sr und Ba eine um so größere positive Wirkung auf die Aktivität der Peroxydase aus, je höher ihr Atomgewicht war. $ZnCl_2$ ruft auch bei dieser Verdünnung eine stark hemmende Wirkung auf die Arbeit von Peroxydase aus. Es ist interessant, daß die Zn-Salze und auch die Cd-Salze auf die Reduktase einen hemmenden Einfluß ausüben[1]). Schließlich übt auch das $MnCl_2$ bei starker Verdünnung eine hemmende Wirkung auf die Peroxydase aus und wird also in dieser Hinsicht aktiv. Es ist interessant, festzustellen, daß von zweiwertigen Metallen eine hemmende Wirkung nur $MgCl_2$ und $MnCl_2$ ausüben; diese Salze werden bei Verdünnung merklich hydrolysiert. Diese Eigenschaft erlaubt die Wirkung der Salze auf das Ferment durch die Annahme zu erklären, daß die Salzlösungen eine Additivität zu Ionen und Molekülen des Ferments zeigen. In starken Konzentrationen existieren die Ionen Mg^{++} und Cl^- in gleichen Mengen; es scheint, daß dabei die positive Wirkung von $Mg^{\cdot\cdot}$ größer ist als die negative Wirkung von Cl-Ionen, darum beobachteten wir einen positiven Effekt. Bei der Verdünnung wächst die Menge der hemmenden Cl-Ionen im Vergleich zu den stimulierenden Ionen des Mg, denn die letzteren bilden schwach dissoziierbare Hydrate. Das gleichgültige Verhalten der Peroxydase zu $MnCl_2$ bei hohen Konzentrationen desselben und die schwächere Wirkung der Peroxydase bei einer Verdünnung der Lösung von $MnCl_2$ spricht dafür, daß die Stärke der gegenseitigen Wirkung der Ionen Mn^{++} und Cl^- ungefähr gleich ist; bei starken Lösungen, in welchen die Zahl der entgegengesetzt geladenen Ionen ungefähr gleich ist, wird auch ihre Wirkung gegenseitig ausgeglichen. Bei der Verdünnung werden schwach dissoziierbare Moleküle von Manganhydroxyd gebildet, dadurch entsteht in der Lösung ein Überschuß an hemmenden Cl-Ionen. Da, im Falle von $MnCl_2$, bei Verdünnung die Cl-Ionen den schwächer als Mg-Ionen wirkenden Mn-Ionen entgegengestellt werden, so ist es begreiflich, daß der Effekt bei einer Zugabe von $MnCl_2$ stärker ist, als bei einer solchen von $MgCl_2$. Die Zunahme der positiven Wirkung von $SrCl_2$ und $BaCl_2$ bei einer Verdünnung derselben zwingt zur Annahme, daß undissoziierte Moleküle eine hemmende Wirkung auf die Arbeit des Ferments auslösen. Der positive Effekt hängt von den Metallionen ab, und da bei Verdünnung immer weniger ganze Moleküle in der Lösung verbleiben, so wird auch die hemmende Wirkung schwächer. Bei weiterer Verdünnung der Salz-

---

[1]) *S. Kostytschew* und *Subkowa*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **3**, 132, 1920. Doch die Ergebnisse der *Kostytschew*schen Versuche wurden später nicht bestätigt. *H. Kumagawa*, diese Zeitschr. **121**, 150, 1921; *Alb. May*, ebendaselbst **141**, 147, 1923.

lösungen muß auch die Konzentration der Ionen sinken, im Zusammenhang damit nimmt auch der Wirkungseffekt der Salzlösungen auf die Fermentarbeit ab.

Das Ammoniumchlorid wirkt wie $MnCl_2$ bei Verdünnung negativ, doch in schwächerem Maße. Hier scheint der Effekt auch auf einer verschiedenen Wirkung von undissoziierten Salzmolekülen und einzelnen Ionen zu beruhen.

4. Versuchsreihe. Änderung der Aktivität von Peroxydase im Zusammenhang mit der Konzentrationsänderung von Chloriden. Bei der eben untersuchten Konzentration (n/800) rufen manche Salze einen Bruch der Kurve, welche die Wirkung der Salze auf die Aktivität der Peroxydase wiedergibt, hervor. So sieht man bei dieser Konzentration eine ausgesprochen hemmende Wirkung von NH_4Cl, $MgCl_2$, $MnCl_2$. Bei einer stärkeren und auch bei einer schwächeren Konzentration wird die Wirkung dieser Salze abgeschwächt. Das $MgCl_2$ ändert seine Wirkung bei einer Steigerung der Konzentration, so daß bei hoher Konzentration seine Wirkung entgegengesetzt wird. Barium und Strontium zeigen bei dieser Konzentration das Maximum ihrer stimulierenden Wirkung. Wir wollen uns nicht länger mit der Wirkung der einzelnen Salze bei verschiedenen Konzentrationen aufhalten und bringen hier eine Tabelle, in welcher die Größen der relativen Aktivität von Peroxydase bei verschiedenen Salzkonzentrationen zusammengestellt sind:

Tabelle V.

Konzentration	Salze				
	NH_4Cl	LiCl	NaCl	KCl	RbCl
n/20	96,36	128,09	52,81	71,77	79,52
n/40	—	—	—	71,94	—
n/80	94,50	97,21	70,58	69,67	85,89
n/400	—	—	—	89,76	—
n/800	90,70	97,83	92,75	96,30	85,64
n/8000 . . .	98,40	100,00	98,12	101,36	—
n/40 000 . . .	98,18	—	97,41	100,48	—
n/200 000 . .	—	—	—	—	—

Konzentration	Salze					
	$MgCl_2$	$CaCl_2$	$ZnCl_2$	$SrCl_2$	$BaCl_2$	$MnCl_2$
n/20	144,59	140,44	0	141,12	119,08	102,25
n/40	—	139,80	—	—	—	—
n/80	117,36	143,45	1,04	146,03	146,58	66,24
n/400	—	—	—	—	—	—
n/800	94,37	143,00	24,02	153,51	165,18	72,16
n/8000 . . .	92,90	127,23	72,84	156,50	160,71	88,07
n/40 000 . . .	98,73	105,95	92,95	—	134,54	90,68
n/200 000 . .	—	98,09	—	112,3	—	—

Die Gruppe der Alkalisalze zeichnet sich dadurch aus, daß diese Salze die Peroxydasewirkung hemmen, nur das LiCl bei einer Konzentration von n/20 bildet eine Ausnahme. Eine Wiederholung der Versuche mit LiCl ergab dieselben Resultate. Die positive Wirkung von LiCl bei hohen

Konzentrationen zwingt zur Annahme, daß dieser Effekt durch ganze Moleküle hervorgerufen wird; das Ausbleiben der Einwirkung von LiCl bei Verdünnung zeigt, daß die entgegengesetzte Wirkung der beiden Ionen gleich ist. Die größte hemmende Wirkung bei hohen Konzentrationen übt das NaCl aus, bei Verdünnung übt das RbCl den größten hemmenden Einfluß. Bei einer Verdünnung, die höher als n/800 ist, wirken die Alkalisalze nicht mehr. KCl und RbCl zeichnen sich durch ihre stabilere Wirkung bei Verdünnung als das NaCl aus, insbesondere gilt das für RbCl. Strontium und Barium sind die stärksten Stimulatoren aus der Gruppe der Erdalkalien. Bei einer Verdünnung n/200000 konnte man noch einen positiven Effekt dieser Salze konstatieren. Eine ähnliche Wirkung übt auch das Calcium aus. Dieses Salz besitzt die Eigentümlichkeit, ungefähr denselben positiven Effekt bei einem breiten Intervall von Konzentrationen (n/20 bis n/800) auszuüben. Bei einer Verdünnung, die stärker als n/40000 ist, büßt das $CaCl_2$ seinen Einfluß auf die Peroxydasearbeit ein.

Der positive Effekt der Erdalkalichloride ist stärker als die hemmende Wirkung der Alkalichloride, außerdem äußert sich die Wirkung der ersteren bei viel stärkerer Verdünnung als die Wirkung der letzteren. Das eigentümliche Verhalten von $MgCl_2$ und $MnCl_2$ bei einer Verdünnung ihrer Lösungen scheint, wie schon früher erwähnt wurde, in einem Zusammenhange mit ihrer Fähigkeit, Hydrate zu bilden, zu stehen. Da das $MgCl_2$ bei einer Verdünnung sehr schnell seinen positiven Effekt einbüßt, so ist sein Einfluß auf den Gang der physiologischen Prozesse, welcher mit der Wirkung der Oxydationsfermente verbunden ist, entweder gleichgültig oder schwach hemmend. Das $MnCl_2$ besitzt in physiologisch-effektiven Konzentrationen eine ausgesprochen hemmende Wirkung. Die Nutzlosigkeit von Mn für die Oxydasenbildung wurde schon mehrmals erwähnt[1]). $ZnCl_2$ wirkte auch bei sehr starken Verdünnungen (n/40000) hemmend auf die Peroxydase ein. Bei diesen Konzentrationen wirken nur zwei Chloride hemmend auf die Peroxydase: $ZnCl_2$ und $MnCl_2$. Unter allen von uns untersuchten Chloriden besitzen gerade diese Chloride ($ZnCl_3$ und $MnCl_2$) am meisten die Fähigkeit der Hydrolysation. Die Wirkung von $ZnCl_2$ basierte, wie es scheint, hauptsächlich auf der Koagulation von Kolloiden, welche bei diesem Vorgang auch die Peroxydase aus der Lösung ausschalten. Wir haben beobachtet, daß Stoffe, die eine Adsorptionsfähigkeit besitzen, den Peroxydaseauszug inaktivieren. (Dabei ist es einerlei, was für eine Ladung diese Stoffe besitzen; so wirken z. B. Talkum, Filtrierpapier in großen Mengen, Tonerde, Eisenhydroxyd.) Dieselbe Wirkung zeigte anscheinend auch das Zink, welches eine merkbare Opaleszenz bei Vermischung von $ZnCl_2$ (bis zu Konzentrationen n/8000) mit Auszügen von Peroxydase hervorrief. Es muß hervorgehoben werden, daß solche Salze, wie $ZnCl_2$ und $MnCl_2$, welche in Lösungen Hydroxyde bilden, mit deren Hilfe eine hydrolytische Oxydation denkbar ist, nicht das Oxydationspotential des Systems *Peroxydase* + H_2O_2 zu erhöhen imstande sind, sondern dasselbe in umgekehrter Richtung beeinflussen.

Graphisch ist die Veränderung der Aktivität der Peroxydase im Zusammenhang mit der Konzentrationsänderung der zu untersuchenden Salze in Abb. 2 wiedergegeben; hier sind auf der Abszissenachse die Kon-

---

[1]) *A. W. van der Haar*, diese Zeitschr. **113**, 19, 1921. Gegenwärtig gibt es Andeutungen dafür, daß das Mn die Vitamine begleitet: *J. S. McHargue*, Journ. of agricult. Research. **27**, Nr. 6, S. 417. 1924.

zentrationen und auf der Ordinatenachse die Größen der relativen Wirkung von Peroxydase aufgetragen.

Wir möchten bei der Betrachtung der Wirkung verschiedener Konzentrationen von Chloriden darauf hinweisen, daß die Erhöhung der Aktivität von Peroxydase durch physiologisch-effektive Konzentrationen der Salze nur durch Erdalkalimetalle hervorgerufen wurde. Da aber diese Metalle den Hauptbestandteil der Asche der Peroxydase bilden, so ist man zu der Annahme berechtigt, daß diese Metalle *nicht nur zufällig die Peroxydase begleiten, sondern auch unentbehrlich für die Aktivität des Ferments sind.* Es könnte sein, daß durch die Erdalkalisalze die Umwandlung des Proferments

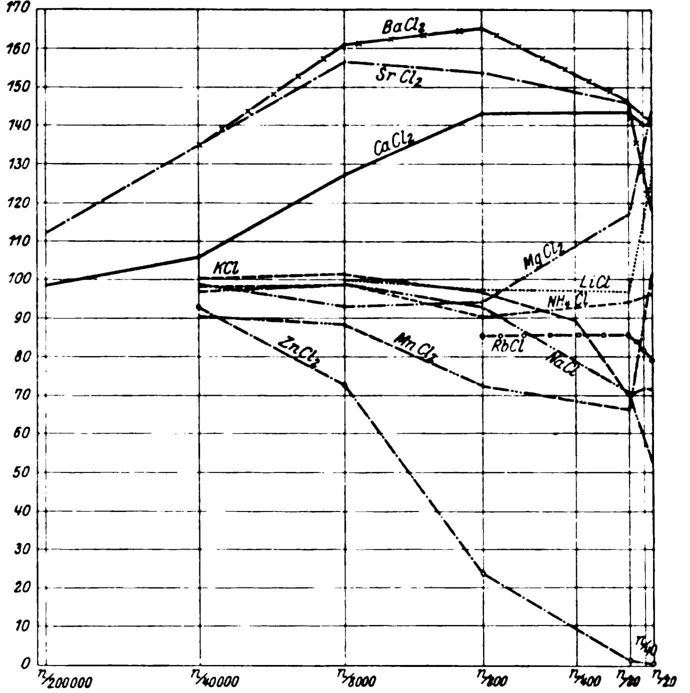


Abb. 2. Änderung der Peroxydasearbeit der Weizensamen unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationen der Chloride.

in die aktive Form geschieht. Der positive Effekt, den die Erdalkalichloride hervorrufen, äußert sich noch schärfer, wenn der fermentative Prozeß nur kurze Zeit durchgeführt wird. Wir sahen, daß das $CaCl_2$ bei einer Einwirkung während 20 Stunden die Aktivität des Ferments um 43 Proz. erhöht (bei einer Konzentration von n/800), bei weiterer Verdünnung und bei gleicher Einwirkungsdauer wird die Wirkung von $CaCl_2$ herabgesetzt. Verkürzt man jedoch die Einwirkungsdauer auf $3\frac{1}{2}$ Stunden bei sonst gleichen Bedingungen, so bekommt man eine Steigerung der Aktivität des Ferments bei einer zweimal schwächeren Konzentration von $CaCl_2$ (n/1600) bis 107 Proz. Ebenso ruft auch das $MgCl_2$, welches bei einer Konzentration n/80 und bei Einwirkungsdauer von 20 Stunden einen Zuwachs der Aktivität von Peroxydase um 17 Proz. zeigt, bei unveränderter Konzentration aber

bei einer Einwirkungsdauer von 3 Stunden eine Steigerung der Peroxydaseaktivität um 75 Proz. Eine Zufügung von Pyrogallollösung und H_2O_2 zum Reaktionsgemisch, welches Erdalkalisalze enthält, ruft eine unmittelbare Ausscheidung von Purpurogallin hervor, die Kontrollportionen ohne Salze bilden den Niederschlag des Purpurogallins viel später. Würde man die stimulierende Wirkung der Erdalkalien unmittelbar nach der Zusammensetzung des Reaktionsgemisches vornehmen, so würde diese Wirkung durch eine unendlich große Zahl ausgedrückt.

Die erhöhte Aktivität von Peroxydase in Anwesenheit von Erdalkalisalzen und speziell in Anwesenheit von Ca erlaubt uns, einige Eigentümlichkeiten des Stoffwechsels von etiolierten Pflanzenkeimlingen bei der Ernährung mit Calciumsalzen aufzuklären. Wir haben gezeigt, daß die Keimlinge, die ihren Vorrat an Kohlenhydraten aufgezehrt haben, in ihren Geweben Ammoniak aufzuspeichern beginnen[1]). Besonders stark äußert sich diese Eigenschaft bei einer Züchtung auf Calciumsalzen. Eine natürliche Ammoniakquelle im Organismus bilden die Aminosäuren; diese letzteren vermögen das Ammoniak im Prozeß der hydrolytischen Oxydation, welche nach dem Typus der *Strecker*schen Reaktion verläuft, abzuspalten:

$$RCHNH_2COOH + 2\,HOH + C_6H_4O_2 = RCHO + H_2O + CO_2 + C_6H_4(OH)_2 + NH_3.$$

Als Akzeptoren der Wasserstoffionen fungieren in den Pflanzen die dem Benzochinon ähnlichen Verbindungen: Sie entstehen aus Hydrochinonderivaten, welche sich aus Glucosiden oder Gerbstoffen bilden können[2]). Das Chinon, welches im Prozeß der hydrolytischen Oxydation bis zum Hydrochinon reduziert wird, wird wieder regeneriert, indem das Hydrochinon in Anwesenheit von Peroxyden durch Peroxydase oxydiert wird. Die Calciumsalze beschleunigen diese Regeneration des Wasserstoffakzeptors durch die Erhöhung der Aktivität von Peroxydase, darum bewirken diese Salze auch eine schnellere Oxydation von Aminosäuren und folglich auch die Bildung von NH_3. Die Erhöhung der Aktivität von Peroxydase durch Anwesenheit von Ca ruft gleichzeitig eine schnellere Verbrennung der intermediären Spaltungsprodukte der Kohlenhydrate hervor; dieses hat aber zur Folge, daß das stickstofffreie Material, welches für die Synthese von organischen Derivaten des Ammoniaks unentbehrlich ist, auch schnell verbraucht wird. Durch die Erhöhung der Aktivität von Oxydationsfermenten unter der Einwirkung von Calciumsalzen können auch die Erscheinungen, welche bei Vegetationsversuchen wahrgenommen werden, und die sich in einer Ammoniakvergiftung bei Ernährung mit Calciumsalzen äußern, erklärt werden. Solche Vergiftungserscheinungen beobachtet man besonders bei Ernährung mit Ammoniaksalzen und Nitriten im ersten Entwicklungsstadium, wenn die assimilierende Blattfläche noch nicht ausgebildet ist und die Synthese der Kohlenhydrate nur schwach ist. Auch der schädliche Einfluß von Kalk auf die Lupine kann durch das oben

---

[1]) *A. J. Smirnow*, diese Zeitschr. **137**, 1, 1923; Zeitschr. f. Pflanzenernährung und Düngung, Teil A, 3. Jahrg., H. 1, 1924.

[2]) Nach *Palladin* müssen die entsprechenden Stoffe als Atmungspigmente (Chinongruppen), Chromogene (Hydrochinongruppen) und auch Prochromogene (ein Stadium, bei welchem die Chromogengruppen verbunden sind) bezeichnet werden.

Gesagte erklärt werden[1]; wie bekannt, zeichnen sich die Lupinen durch ihre Armut an Reservekohlenhydraten und den Reichtum an Stickstoffreservestoffen aus.

5. Versuchsreihe. Die Einwirkung von Eisenoxyd- und Quecksilberoxydsalzen auf die Aktivität von Peroxydase. Nach *Willstätter* und *Stoll*[2]) befindet sich in der Asche von Peroxydase in kleinen Mengen Eisen; bei Reinigung von Präparaten kann man wahrnehmen, daß mit einer Steigerung der Aktivität des Ferments auch der Gehalt an Eisen im Ferment zunimmt. In der Voraussetzung, daß das organisch gebundene Eisen die Übertragung von Sauerstoff übernimmt und somit die Wirkung von Peroxydase bedingt [solch eine Vermutung wurde von vielen aufgestellt[3]], hat der Verfasser eine Berechnung unternommen. Es stellte sich dabei heraus, daß die unter dem Einfluß des Peroxydasepräparats ausgeschiedene Menge des Purpurogallins in keinem direkten Verhältnis zum Eisengehalt des Präparats stand und viel größer war, als es nach der Berechnung (vom Eisengehalt ausgehend) zu erwarten war. Gibt man künstlich zum Peroxydasepräparat Eisenoxydulsalze, so wird die Aktivität des Präparats dadurch nicht erhöht. Die Wirkung ist in diesem Falle gleich der Summe beider wirkenden Faktoren. Die Vorgänger von *Willstätter* und *Stoll* erhielten zwar weniger aktive Peroxydasepräparate, aber dieselben waren ganz frei von Eisen[4]). Das alles spricht dafür, daß die Anwesenheit von Eisen nicht als eine unbedingt nötige Bedingung für die Peroxydasearbeit angesehen werden muß. Dessen ungeachtet war es doch von Interesse, noch einmal die Eisenwirkung als eines Regulators bei der Veränderung der Aktivität von Peroxydase zu prüfen; auch schien es interessant, die Wirkung von Eisen mit der Wirkung anderer Komponenten der Peroxydasenasche zu vergleichen. Um die selbständige Wirkung des Eisens als eines Induktors abzuschwächen, haben wir das Eisenoxydsalz der Weinsäure[5]) genommen. Ein organisches Salz bildet insofern einen Vorzug, als man dieses Salz in Lösung bei der Reaktion unseres Substrats (p_H 6,5 bis 6,6) haben konnte, außerdem war das Eisen in diesem Falle in einer Form gegeben, die dem natürlichen Vorkommen des Eisens im Organismus nahestand. Um die Wirkung der Weinsäure messen zu können, haben wir in unserem Versuch auch eine Portion mit weinsaurem Ammonium eingeschaltet; den Einfluß der Ammoniumsalze auf die Arbeit des Ferments haben wir schon früher untersucht und dabei seine Wirkung auf die Peroxydasearbeit als eine schwache kennengelernt. Außer Eisen haben wir in dieser Versuchsserie auch die Wirkung von $HgCl_2$ auf die Peroxydasearbeit untersucht. Die Untersuchung von Quecksilber war insofern von Interesse, als dieses Metall eine ähnliche physiologische Wirkung wie Zink ausübt[6]). Wir brauchten für unsere Ver-

[1]) *Th. Pfeffer* und *W. Simmermacher*, Landwirtschaftliche Versuchsstation **93**, 1, 1919.

[2]) *Willstätter* und *Stoll*, l. c., S. 60.

[3]) *G. André*, Chemie Vegetale **1**; *J. Wolf*, C. r. **146**, 142, 781, 1217, 1908; **148**, 500; *Wolf* et *Stoecklin*, Ann. de l'Inst. Pasteur **23**, 84, 1909.

[4]) *E. de Stoecklin*, These, Genf 1907; *A. Bach* und *J. Tscherniak*, Ber. d. chem. Ges. **41**, 2345, 1908; *S. Kostytschew*, Zeitschr. f. phys. Chem. **67**, 116, 1910; *A. Bach*, Ber. d. chem. Ges. **43**, 364, 1910.

[5]) *N. Schilow*, Über gekoppelte Oxydationsreaktionen (russisch), Moskau 1905; *F. Röhmann* und *T. Shmamine*, diese Zeitschr. **42**, 235, 1912.

[6]) *W. Butkewitsch* und *Fr. W. G. Orlow*, diese Zeitschr. **132**, 556, 1922.

suche nur schwache Lösungen dieser Salze, denn nur schwache Konzentrationen dieser Salze sind physiologisch interessant, außerdem sind hohe Konzentrationen von Salzen der schweren Metalle technisch unbequem zu verwenden: so gibt Eisen in hohen Konzentrationen mit Pyrogallol einen schwarzen, klebrigen Niederschlag, welcher nur schwer von Purpurogallin abzuwaschen ist. Quecksilber ruft bei hohen Konzentrationen ein starkes Gerinnen der Kolloide des Auszuges hervor, was auch sehr unbequem beim Auswaschen des Purpurogallins ist. Infolge schwacher Konzentration der Salzlösungen haben wir die Dauer der fermentativen Reaktion bis auf 3½ Stunden verkürzt, wir wollten dadurch schärfer ausgeprägte Resultate erhalten. Um die Wirkung von Eisen mit der Wirkung anderer Aschenkomponenten von Peroxydase zu vergleichen, haben wir auch Portionen des Auszuges mit $CaCl_2$ in gleicher Konzentration hergestellt. Die Resultate sind in Tabelle VI wiedergegeben:

Tabelle VI.

10^{-4} n Konzentration von Salzen:	$Fe_2(C_4H_4O_6)_3$	$(NH_4)_2C_4H_4O_6$	$CaCl_2$
Relative Aktivität von Peroxydase	114,0	96,0	150,0
p_H der Salzlösung	6,6	6,7	6,6
p_H der Kontrollportion ohne Salze	6,6	6,6	6,6

Die Einwirkung des Eisensalzes auf die Peroxydasearbeit war viel schwächer als die Wirkung der gleichen Konzentration von $CaCl_2$. Da die Anwesenheit von weinsaurem Ammonium für die Peroxydasearbeit ohne Bedeutung ist, so kann man annehmen, daß der positive Effekt bei der Zugabe von $Fe_2(C_4H_4O_6)_3$ durch die Wirkung des Metallions verursacht wird. Das Eisensalz übte auch in Abwesenheit von Peroxydase (gekochte Portion), ähnlich wie das Zink, eine katalytische Wirkung bei der Oxydation von Pyrogallol durch Hydroperoxyd aus; wir finden in der Literatur Angaben, nach denen die Eisenoxydsalze, wenn auch in schwächerem Grade als die Eisenoxydulsalze, das Oxydationspotential erhöhen können[1]). Wir brauchten folgende Mengen von n/10 $KMnO_4$ für die durch Kochen inaktivierten Portionen: Ohne Salze 0,35 ccm, $Fe_2(C_4H_4O_6)_3$ 2,55 ccm, $(NH_4)_2C_4H_4O_6$ 0,35 ccm und $CaCl_2$ 0,55 ccm. Der Versuch mit Eisen wurde mit anderem Material wiederholt (auch Weizensamen, aber einer anderen Ernte entnommen), wobei die Dauer der fermentativen Einwirkung statt 3½ Stunden auf 20 Stunden verlängert wurde, es wurden ferner zwei Konzentrationen von Eisensalzen genommen.

Tabelle VIa.

Konzentration $Fe_2(C_4H_4O_6)_3$	Relative Aktivität von Peroxydase	p_H der Salzmischung	p_H der Kontrollportion ohne Salze
10^{-4}n	113,8	6,6	6,55
$5 . 10^{-5}$n	105,3	6,6	

Wurde die Eisensalzlösung verdünnt, so sank der Effekt. Wir sehen also, daß *im Vergleich mit Erdalkalisalzen das Eisen eine viel schwächere Wirkung auf die Aktivität von Peroxydase auszulösen vermag, darum können die*

[1]) *F. Röhmann* und *T. Shmamine*, diese Zeitschr. **42**, 235, 1912; *N. Schilow*, l. c.

Eisensalze nicht als ein spezifischer Faktor, der den Peroxydasen ihre Aktivität verleiht, angesehen werden.

Die Wirkung von $HgCl_2$ wurde bei noch größeren Verdünnungen untersucht. Größere Konzentrationen haben außer technischen Unbequemlichkeiten noch den Nachteil, daß das Sublimat nach *Willstätter* und *Stoll* die Peroxydase ähnlich wie die Säuren zerstört. Die fermentative Wirkung wurde bei verschiedenen Konzentrationen der Sublimatlösungen während 20 Stunden bei einer Temperatur von 22° C untersucht.

Tabelle VII.

Konzentration von $HgCl_2$:	10^{-4} n	10^{-5} n	10^{-6} n	10^{-7} n
Relative Aktivität v. Peroxydase	95,27	102,08	103,54	109,65
p_H der Salzmischung	6,4	6,5	6,5	6,5
p_H der Kontrollportion ohne Salze	6,5	6,5	6,5	6,5

Bei der Vermischung von 2 . 10^{-4} n $HgCl_2$-Lösung mit dem Wasserauszug entstand eine opaleszierende Trübung, die der durch Zinksalze hervorgerufenen ähnlich war. Bei starker Verdünnung von Sublimat ist keine merkliche Koagulation wahrzunehmen. Bei einer Verdünnung, die eine Koagulation hervorruft, ist die hemmende Wirkung nur schwach. Bei starker Verdünnung wird eine stimulierende Wirkung (bis 9,5 Proz.) beobachtet. Also unterscheidet sich die Einwirkung des Sublimats auf die Aktivität von Peroxydase von der Einwirkung des $ZnCl_2$. Bei einer Konzentration n/8000 ruft das $ZnCl_2$ eine Hemmung bis zu 30 Proz. hervor (im Vergleich zur Oxydasearbeit in der Kontrollportion bei gleichem p_H doch ohne Salze); bei einer sehr nahen Konzentration von $HgCl_2$ (n/10000 und bei gleichem p_H 6,5 bis 6,4) ist die hemmende Wirkung auf die Oxydasearbeit kaum wahrzunehmen. Eine Koagulation von Kolloiden des Auszuges und der Glucoside, die nach *Willstätter* und *Stoll* die Peroxydase begleiten, ruft eine Abnahme der Konzentration des Ferments in der zurückgebliebenen Lösung hervor; diese Abnahme der Konzentration ist dadurch zu erklären, daß Peroxydase die Fähigkeit besitzt, von anderen Stoffen adsorbiert zu werden (wir haben das schon früher hervorgehoben); auch Kolloide vermögen, wie es scheint, bei der Koagulation Peroxydase zu adsorbieren. Wir können uns also die Wirkung des Sublimats auf Peroxydase folgendermaßen erklären: Das Quecksilberion wirkt auf die Peroxydasearbeit stimulierend, doch tritt gleichzeitig bei der Zugabe von Sublimat eine Abnahme der Konzentration des Ferments infolge einer teilweisen Ausschaltung des letzteren aus der Reaktion ein; dieses geschieht durch das Gerinnen der Kolloide, die einen Teil des Ferments adsorbieren. Darum kann der positive Effekt der Einwirkung des Quecksilberions nur dann bemerkbar werden, wenn die Verdünnung der Sublimatlösung so weit fortgeschritten ist, daß die Koagulation von Kolloiden unbedeutend wird: ist solch eine Verdünnung erreicht, so wird die positive Wirkung des Hg stärker als der hemmende Einfluß der Adsorption durch das Gerinnen der Kolloide.

6. Versuchsreihe. Kombinierte Wirkung von Chloriden auf die Aktivität der Peroxydase. Der Antagonismus der Salze kann auch in einer Wirkung derselben auf die Aktivität von Fermenten sich äußern. Dieses hat *Neuschlosz*[1]) für Invertase gezeigt. Die hemmende Wirkung von Chloriden auf

[1]) *S. M. Neuschlosz*, Pflügers Arch. 181, 45, 1920.

die Aktivität der Invertase konnte durch ein bestimmtes Verhältnis der Kationen untereinander ausgeglichen werden; dieses Verhältnis der Kationen war der Kombination, die für lebende Organismen durch *J. Loeb* festgestellt wurde, sehr ähnlich[1]. Solch eine antagonistische Wirkung der Salze auf Invertase kann nur durch die kolloidale Natur der letzteren erklärt werden; infolge einer solchen Beschaffenheit ist das Ferment befähigt, die entgegengesetzt geladenen Salzionen zu adsorbieren. Die Aufhebung der hemmenden Wirkung von Kationen durch gleichzeitige Wirkung derselben wird vom Verfasser durch gegenseitiges Verdrängen adsorbierender Ionen von der Oberfläche des Kolloids erklärt. Der Antagonismus von Salzen kann, wie *Neuschlosz*[2]) gezeigt hat, außer an Fermentkolloiden auch an Änderungen der chemisch-physikalischen Eigenschaften solcher organischen Kolloide wie Lecithin wahrgenommen werden.

Da der fermententhaltende Auszug durch verschieden geladene adsorbierende Stoffe inaktiviert werden kann, so muß angenommen werden, daß Peroxydase an und für sich keine Ladung besitzt. Die Adsorption von Peroxydase durch Kolloide ist ein mechanischer Vorgang und hängt nicht von der Ladung des Kolloids ab. Infolge solcher Indifferenz der Peroxydase zur Ladung der adsorbierenden Stoffe muß man annehmen, daß dieses Ferment elektroneutral ist; darum darf man bei gleichzeitiger Anwesenheit von zwei Salzen bei Peroxydase keine Änderung der Aktivität (wie dieses bei Invertase der Fall war) erwarten. Um das Zusammenwirken einseitig auf Peroxydase einwirkender Kationen zu prüfen, haben wir $CaCl_2$ und $MgCl_2$ genommen; das $MgCl_2$ wurde in Konzentrationen, die eine Erhöhung der Fermentwirkung verursachen, untersucht. Es wurden vier aktive Portionen und vier entsprechende inaktivierte Kontrollportionen untersucht. Die erste Portion wurde ohne Zusatz von Salzen bereitet, die zweite Portion enthielt als Zusatz $MgCl_2$ in einer Konzentration von n/100, die dritte Portion wurde mit $CaCl_2$ in einer Konzentration von n/1000 bereitet, und endlich die vierte Portion enthielt die beiden Salze in entsprechenden Konzentrationen. Während annähernd 20 Stunden blieben die Kölbchen mit dem Auszug im Thermostaten bei 25° C stehen; nach Verlauf dieser Zeit wurden die Proben inaktiviert und es wurde ferner das Purpurogallin bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle VIII gegeben:

Tabelle VIII.

Portionen:	Ohne Salze	$MgCl_2$ 0,01 n	$CaCl_2$ 0,001 n	$MgCl_2$ 0,01 n + $CaCl_2$ 0,001 n
Oxydationsaktivität des Ferments . .	100,0	125,0	150,0	172,4
p_H	6,5	6,4	6,5	6,4

Wir sehen also, daß hier die Salze keine antagonistische Wirkung ausüben; das Salzgemisch äußert in seiner Wirkung auf Peroxydase eine Additivität.

Wir unternehmen ferner einige Versuche, in denen wir einige auf die Peroxydasearbeit entgegengesetzt wirkende Salze KCl und $CaCl_2$ untersuchten. Bei diesen Versuchen nehmen wir diese Salze in solchen Mengen, daß die Gesamtkonzentration der Salze immer gleich n/40 blieb; es wurde

[1]) *J. Loeb*, diese Zeitschr. **31**, 450, 1911.
[2]) *S. M. Neuschlosz*, ebendaselbst, S. 15.

nur das gegenseitige Verhältnis der Salze zueinander geändert. Bei solcher Versuchsanordnung blieb die Wirkung des Anions bei allen Konzentrationen unverändert. Dabei brauchten wir folgende Verfahren: Wir vermischten Chloridlösungen gleicher Konzentration in gewünschten Verhältnissen; ferner nahmen wir je 25 ccm solcher Gemische und vermischten diese Portionen einmal mit gleichen Volumen des aktiven Auszuges und einmal mit durch Kochen inaktiviertem Auszug. Aus den so bereiteten Portionen wurden wie gewöhnlich 10 ccm der Flüssigkeit für die Bestimmung von p_H entnommen, zu den übrigen 40 ccm fügten wir Pyrogallol und eine Lösung von H_2O_2 in üblichen Mengen bei. Die fermentative Wirkung dauerte annähernd 20 Stunden bei einer Temperatur von 24 bis 26° C.

Die Veränderung von p_H infolge der Zugabe vom Salzgemisch war nicht größer als 0,1, in der Mehrzahl der Fälle war diese Änderung nur 0,05 p_H.

Die dritte horizontale Reihe der Tabelle IX zeigt die Veränderungen der Fermentwirkung unter dem Einfluß des Salzgemisches, dessen Zusammen-

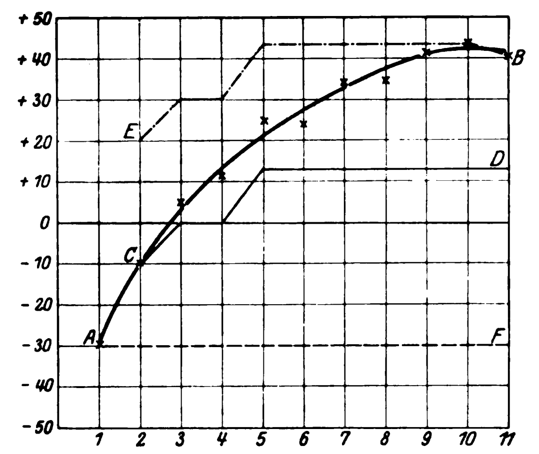


Abb. 3. Einfluß der Zusammenwirkung von KCl und $CaCl_2$ auf die Peroxydasearbeit.

setzung in der Reihe 2 angegeben ist. Die vierte und fünfte Reihe stellen die Veränderungen der Peroxydasewirkung unter dem Einfluß der einzelnen Salzkomponenten der Versuchsmischung dar; diese „partiellen" Konzentrationen sind in den zwei letzten Reihen der Tabelle IX angeführt. Die Größen, die in der vierten und fünften Reihe angeführt sind, werden durch Interpolieren der Zahlen aus der Tabelle V und der Abb. 2 erhalten. Graphisch sind die Zahlen der Tabelle IX in der Abb. 3 wiedergegeben. Auf der Abszissenachse sind hier die Salzgemische nach derselben Reihenfolge wie in der Tabelle IX markiert; die Ordinaten stellen die Änderungen der Peroxydasewirkung bei Zugabe von Salzmischungen dar, wobei die positiven Änderungen nach oben von der Nullinie abgezählt werden, die negativen hingegen nach unten von derselben Linie. Die Kurve *A B* zeigt die beobachtete Änderung der Aktivität des Ferments unter dem Einfluß der Veränderungen des Verhältnisses $KCl/CaCl_2$ und entspricht der dritten Reihe der Tabelle IX. Die Linie *AF* stellt die Wirkung von KCl auf die Aktivität von Peroxydase vor, in welcher dieses Salz in der Salzmischung

enthalten ist (es ist also die Wirkung, die den Reihen 4 und 6 der Tabelle IX entspricht). *EB* ist eben solch eine Linie für $CaCl_2$ und entspricht der Reihe 5 und 7. Endlich entspricht die Linie *CD* der algebraischen Summe der Wirkungen des KCl und $CaCl_2$.

Ein Salzgemisch, welches aus die Peroxydase entgegengesetzt beeinflussenden Salzen besteht, übt keine additive Wirkung aus. Nur in einem Falle beim Verhältnis der Salze KCl : $CaCl_2$ = 998 : 2, konnte man eine Additivität beobachten; in allen übrigen Verhältnissen übte das $CaCl_2$ einen stärkeren Einfluß als das KCl aus; dieses Übergewicht in der Wirkung ist um so größer, je größer der Gehalt an $CaCl_2$ in der Salzmischung ist.

Also äußert sich die gemeinsame Einwirkung der Salze auf die Peroxydasearbeit verschieden, je nach der Art des Einflusses, den jede Komponente an und für sich auf die Peroxydasearbeit auszuüben vermag. Verwendet man für Salzgemische einseitig wirkende Salze, so wird die Wirkung einzelner Salzkomponenten auf die Peroxydasearbeit addiert. Im entgegengesetzten Falle, bei Verwendung von Salzen, welche die Peroxydasearbeit entgegengesetzt beeinflussen, übt das Salzgemisch eine kompensierbare Wirkung aus, wobei der Einfluß des aktivierten Salzes parallel mit dem Anteil dieses Salzes im Gemisch wächst. Der dominierende Teil des Salzgemisches vermag seinen vollen Einfluß auf die Peroxydase schon dann auszuüben, wenn dieses Salz nach dem Gewicht ein Viertel des Salzgemisches ausmacht.

Der schädliche Einfluß von übermäßigen Kalkgaben, besonders bei jungen Pflanzenorganismen, die arm an Reservekohlenhydraten sind (Lupinen), kann bekanntlich nicht durch Mg oder K-Salze beseitigt werden; dieses haben schon *Th. Pfeiffer* und *W. Simmersmacher*[1]) gezeigt. Auch wir haben in den Versuchen, die wir 1923 unternommen hatten, die Beobachtung gemacht, daß eine Beigabe von Mg-Salzen zu übermäßigen Dosen von Ca nicht die schädliche Wirkung des letzteren zu hemmen vermochte; im Gegenteil, bei diesem Verfahren litt die Lupine noch stärker[2]). Der Antagonismus der Salze äußert sich nur bei einigen physiologischen

Tabelle IX.

NN der Mischungen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Verhältnis von $KCl/CaCl_2$	1/0	998/2	996/4	992/8	980/20	960/40	920/80	880/120	800/200	600/400	0/1
Änderung d. Einwirkung des Ferments im Salzgemisch	−30	−10	+5	+11,5	+24	+23	+34	+34	+41	+43	+40
Änderung d. Wirkung des Ferments in einzelnen entsprechenden Konzentrationen: KCl	−30	−30	−30	−30	−30	−30	−30	−30	−30	−30	—
$CaCl_2$	—	+20	+30	+30	+43	+43	+43	+43	+43	+43	+40
Konzentration der Salzkomponenten: KCl	n/40	annähernd n/40	annähernd n/40	annähernd n/40	annähernd n/41	annähernd n/42	annähernd n/43	annähernd n/45	annähernd n/50	annähernd n/67	—
$CaCl_2$	—	$0{,}5\,n\,10^{-4}$	$1\,n\,10^{-4}$	$2\,n\,10^{-4}$	$0{,}5\,n\,10^{-3}$	$1\,n\,10^{-3}$	$2\,n\,10^{-3}$	$3\,n\,10^{-3}$	$0{,}5\,n\,10^{-2}$	$1\,n\,10^{-2}$	1/40

[1]) *Th. Pfeiffer* u. *W. Simmermacher*, l. c.

[2]) Nicht veröffentlicht.

Vorgängen. Fälle, in welchen die Salzgemische eine Additivität zeigen, sind nicht selten, in manchen Fällen beobachtet man einen Synergismus der Komponenten oder auch eine solche ungleichmäßige Kompensationswirkung, wie wir sie bei der Wirkung des Gemisches von KCl und $CaCl_2$ auf die Aktivität von Peroxydase wahrgenommen haben. Wir haben hier einige Resultate, die bei unseren Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Kationen auf die Peroxydasearbeit im Wasserauszug aus Weizensamen gewonnen worden sind, näher betrachtet und diskutiert. Ganz natürlich drängt sich die Frage auf: Was für ein Nutzen ergibt sich für den pflanzlichen Organismus durch die Wirkung verschiedener Kationen auf die Peroxydasearbeit? Wir denken, daß dabei keine einheitliche Lösung dieser Frage für verschiedene Pflanzen und verschiedene Entwicklungsstadien möglich ist. Je nach der Zusammensetzung der pflanzlichen Zelle, dem Verhältnis zwischen stickstoffhaltigen Reservestoffen und den Kohlenhydraten der Pflanze kann das Endergebnis, welches durch den Ernteertrag ausgedrückt wird, verschieden sein. Solche Salze, die die Wirkung von Oxydationsfermenten fördern, müssen auf die Entwicklung der Pflanzen in dem Falle einen günstigen Einfluß ausüben, wenn die Pflanzen eine genügende Menge von Kohlenhydraten als Reservestoff besitzen; solche Pflanzen sind die Gramineen und die an Kohlenhydraten reichen Papillionaceen. In diesem Falle ruft die verstärkte Oxydation, infolge der frei werdenden Energie, einen gesamten Stoffwechsel hervor, der für synthetische Prozesse im Organismus unentbehrlich ist; dabei werden keine schädlichen Nebenprodukte aufgespeichert. Das infolge der hydrolytischen Oxydation in erhöhtem Maße durch aktive Oxydasen nach dem Typus der *Strecker*schen Reaktion gebildete Ammoniak wird in Anwesenheit stickstofffreien Materials schnell in für den Aufbau der Gewebeeiweißstoffe nötige Komponenten verarbeitet. Wenn die Mengen stickstoffhaltiger und stickstofffreier Verbindungen der Reservestoffe nicht untereinander ausgeglichen sind, wie das bei Lupine der Fall ist, leidet die Pflanze in den ersten Keimungsstadien unter dem Mangel an Kohlenhydraten. Bei der Erhöhung der Aktivität von Oxydasen wird ein Mangel des plastischen Materials, welches zum Aufbau der für die Eiweißsynthese nötigen Aminosäuren nötig ist, eintreten. Das durch erhöhte Oxydasearbeit in gesteigerten Mengen gebildete Ammoniak wird nicht verarbeitet und die Pflanzen werden vergiftet. Die schädliche Wirkung der Faktoren, welche die Oxydationsprozesse beschleunigen, wird durch den aus dem Außenmedium von der Pflanze aufgenommenen Stickstoff, besonders in Form von Ammoniak oder salpetriger Säure noch verstärkt [der Stickstoff der Nitrite wird, wie es scheint, schneller als der Stickstoff der Nitrate reduziert [1])].

[1]) *A. J. Smirnow*, Journ. f. Landwirtsch. Wissensch., Nr. 3. Moskau 1924. Die Reduktion von Nitraten und Nitriten hängt nicht von der Menge der Kohlenhydrate ab. Das Endprodukt der Reduktion bildet das Ammoniak. Da NO_2 sehr schnell bis NH_3 reduziert wird, so verläuft die Aufnahme des Nitritstickstoffs von der Pflanze schneller als die Aufnahme des Ammoniaks in dem Falle, wenn der Ammoniakstickstoff nicht von der Pflanze in organische Derivate des letzteren verarbeitet wird. Diese schnellere Aufnahme hängt nicht von einer schnelleren Permeabilität der Nitrite durch die Plasmahaut ab, sondern wird durch den Konzentrationsunterschied zwischen der Konzentration von NO_2 im Außenmedium und in den Wurzeln bedingt.

7. Versuchsreihe. Die Einwirkung von Anionen auf die Peroxydasearbeit im Wasserauszug aus Weizensamen. Um die Einwirkung der Anionenreihe zu untersuchen, haben wir Ammoniumsalze genommen. Die Ammoniumsalze besitzen vor anderen Salzen den Vorzug, daß das NH_3-Ion nach unseren früheren Versuchen sich als sehr wenig aktiv erwies. Wir dürften daher annehmen, daß bei Versuchen mit Ammoniumsalzen die Anionenwirkung nicht durch die Wirkung des Kations geändert wird. Wir brauchten für unsere Versuche n/10 Lösungen und bereiteten dieselben aus reinen Salzen (*Kahlbaums* Präparat). Um solche n/10 Lösungen zu erhalten, nahmen wir anfänglich etwas stärkere Konzentrationen, bestimmten

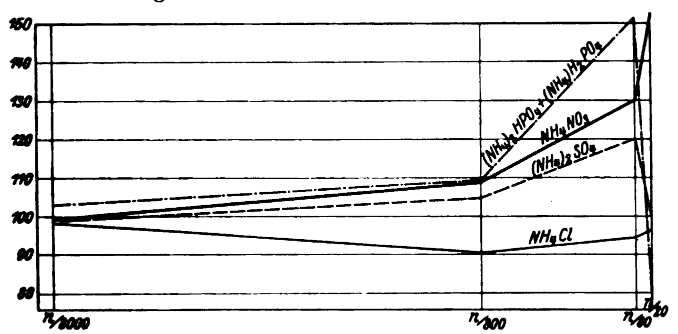


Abb. 4. **Einwirkung von Anionen bei verschiedenen Konzentrationen auf die Peroxydasearbeit.**

danach ihre Reaktion und stellten dieselbe durch Beigabe von entsprechender Säure oder Ammoniak auf die gewünschte Höhe ein. Sodann wurde eine Lösung bereitet, die genau eine Konzentration n/10 aufwies. Es wurden folgende Anionen untersucht: Cl^-, NO_3^-, $SO_4^=$, $PO_4^{\equiv}$. Die Phosphatlösungen von entsprechender Reaktion wurden durch Vermischen dezinormaler Lösungen des primären und sekundären Ammoniumphosphats bereitet. Das Verhältnis der Komponenten und die Dauer der Einwirkung waren dieselben, wie in der Kationenreihe. Die Resultate der Einwirkung von Ammoniumsalzen auf die Peroxydasearbeit sind in Tabelle X und Abb. 4 wiedergegeben.

Tabelle X.

Salze	Konzentrationen:	n/20	n/80	n/800	n/8000
NH_4Cl	Relative Aktivität des Ferments	96,34	94,55	90,70	98,40
	p_H der Salzportionen	6,7	6,5	6,5	6,55
	p_H d. Kontrollportionen ohne Salze	6,7	6,5	6,5	6,55
NH_4NO_3	Relative Aktivität des Ferments	152,6	130,2	108,8	99,6
	p_H der Salzportionen	6,55	6,5	6,5	6,5
	p_H d. Kontrollportionen ohne Salze	6,45	6,45	6,45	6,45
$(NH_4)_2SO_4$	Relative Aktivität des Ferments	99,8	120,1	105,3	99,1
	p_H der Salzportionen	6,5	6,5	6,5	6,5
	p_H d. Kontrollportionen ohne Salze	6,5	6,5	6,5	6,5
$NH_4H_2PO_4 + (NH_4)_2PO_4$	Relative Aktivität des Ferments	84,6	151,6	109,5	103,1
	p_H der Salzportionen	6,6	6,6	6,6	6,55
	p_H d. Kontrollportionen ohne Salze	6,55	6,55	6,55	6,55

Die Valenz des Anions bestimmte nicht die Stärke seiner Wirkung. Die maximale Wirkung wiesen die Nitrate und Phosphate auf, die minimale

Wirkung die Chloride. Es ist charakteristisch, daß die Salze der Anionenreihe in hohen Konzentrationen eine Wirkung auf die Peroxydasearbeit ausübten. Eine Ausnahme bildet nur das Chlorid, welches die maximale Wirkung bei einer Konzentration von n/800 zeigt; doch übt das Chlorid überhaupt nur eine schwache Wirkung aus. Das Nitrat unterscheidet sich nach seiner Wirkung von anderen Salzen dadurch, daß seine Wirkung bei Verdünnung immer schwächer wird; doch auch bei großer Verdünnung bleibt die Wirkung des Nitrats positiv; solch ein Verhalten des Nitrats scheint darauf hinzudeuten, daß die ganzen Moleküle des Salzes stimulierend auf Peroxydase einwirken.

Wenn wir die Wirkung des Nitrats auf Peroxydase mit seiner Wirkung auf Katalase (I. Mitteilung) vergleichen, so sieht man, daß in beiden Fällen die Wirkung der Nitrate entgegengesetzt ist. Die Vergrößerung des Oxydationspotentials des Systems *Peroxydase* + H_2O_2 konnte also nicht allein durch eine Aktivierung der Peroxydase erklärt werden; sondern das Nitrat konnte hier auch die Zerstörung der Peroxydase durch Katalase verhüten. Das Sulfat sowie auch das Phosphat üben die größte Wirkung auf die Peroxydasearbeit in einer Konzentration von n/80 aus; nach beiden Seiten von dieser Konzentration ist die Wirkung viel kleiner; besonders stark sinkt die Wirkung der Sulfate und Phosphate bei einer Steigerung der Konzentration über n/80. Für das Phosphat nimmt die stimulierende Wirkung bei einer Steigerung der Konzentration dermaßen ab, daß bei einer Konzentration von n/20 diese Wirkung in eine hemmende übergeht.

Die Salze der Anionenreihe, NH_4Cl ausgenommen, zeichnen sich durch eine schnelle Abnahme ihrer Wirkung bei wachsender Verdünnung aus, und in dieser Beziehung ist hier eine Analogie in der Wirkung einwertiger Chloride zu ersehen; einwertige Chloride büßen ihre Wirkung auf die Peroxydasearbeit bei einer Konzentration von n/800 ein; doch ist die Wirkung der Chloride der Wirkung von Salzen der Anionenreihe gerade entgegengesetzt. Der Zuwachs des positiven Effekts unter dem Einfluß von Salzen der Anionenreihe erfolgte auf eine andere Art, als es bei den Versuchen mit Chloriden der Erdalkalien der Fall war. Die Chloride der Erdalkalien riefen die Bildung eines Niederschlages von Purpurogallin sehr schnell nach der Bereitung des Reaktionsgemisches hervor (nach Verlauf einiger Sekunden); unter dem Einfluß von Salzen der Anionenreihe entstand der Niederschlag des Purpurogallins nur äußerst langsam. Doch färbte sich bei unmittelbarer Beobachtung die Lösung mit Phosphat viel intensiver. Für Portionen mit hoher Konzentration von Phosphat war die Bildung eines gelben klebrigen Niederschlages charakteristisch, solch eine Erscheinung wurde sowohl bei den Versuchsportionen als auch bei den Kontrollportionen (gekochter) wahrgenommen.

Die Färbung des Filtrats war in den Portionen mit Phosphat intensiver als in den Kontrollportionen ohne Salze. Die Mengen von Chamäleon, welche für die (inaktivierten) Kontrollportionen verwendet wurden, unterschieden sich nicht merklich von den üblichen Normen und von den Mengen, die für die Kontrollportionen (inaktivierte) ohne Salze verwendet wurden.

Bei der Untersuchung, welche Änderung die Salze der Anionenreihe auf das Potential $Fe^{\cdot\cdot} + H_2O_2$ hervorzurufen vermögen, zeigte es sich, daß hier auch keine erhöhte Oxydation von Pyrogallol stattfindet; dasselbe war auch bei der Untersuchung der Salze der Kationenreihe der Fall. Es würde also falsch sein, anzunehmen, daß die erhöhte Oxydationsfähigkeit des Systems *Peroxydase* + H_2O_2 durch Bildung von Komplexen aus Salzen und Substrat zustandekommt. Man konnte folgende Reihenfolge der

Anionen nach der veränderten Intensität der Färbung feststellen (eine Schwächung der Farbe von links nach rechts):

Ohne Salze > NH_4Cl > $NH_4H_2PO_4$ + $(NH_4)_2HPO_4$ > NH_4NO_3 > $(NH_4)_2SO_4$.

Das Reaktionsgemisch wurde in derselben Weise zusammengesetzt, wie dieses bei der Untersuchung der Wirkung der Kationenreihe der Fall war.

Die Phosphatportion zeichnete sich vor den übrigen Portionen dieser Reihe dadurch aus, daß diese Portion noch vor der Zugabe von H_2O_2 und $Fe^{\cdot\cdot}$ sich gelb zu färben anfängt. Wir untersuchten den Einfluß, den die Salze der Anionenreihe auf die Oxydationsfähigkeit des Auszuges aus Weizensamen in Abwesenheit von H_2O_2 auszuüben vermögen. Es stellte sich dabei heraus, daß das Nitrat und besonders das Phosphat in gewissem Maße das fehlende Hydroperoxyd ersetzen können oder die Bildung von Peroxydverbindungen zu fördern vermögen. Es wurde ein Versuch mit drei Salzen, die Sauerstoff enthielten und einen Zuwachs des Oxydationspotentials des Systems *Peroxydase* + H_2O_2 hervorriefen, gemacht. Das Nitrat wurde in zwei Konzentrationen, n/20 und n/80, das Sulfat und das Phosphatgemisch in einer Konzentration von n/80 verwendet. Die gewonnenen Resultate sind in Tabelle XI zusammengestellt:

Tabelle XI.

Konzentration	Menge der verbrauchten $KMnO_4$ in ccm		p_H der Salzportion	p_H der Kontrollportion ohne Salze
	aktive	inaktive		
	NH_4NO_3			
n/20	2,25	1,55	6,65	6,55
n/80	0,65	0,5	6,55	6,55
	$(NH_4)_2SO_4$			
n/20	—	—	—	—
n/80	1,25	1,25	6,55	6,55
	$(NH_4)_2HPO_4 + NH_4H_2PO_4$			
n/20	—	—	—	—
n/80	7,65	1,75	6,65	6,65

In der aktiven Kontrollportion ohne Salze wurde 0,5 ccm $KMnO_4$ verbraucht.

Auch ohne H_2O_2 vermögen die Salze im Auszug aus Weizensamen ein kleines Oxydationspotential hervorzurufen. Das bezieht sich sowohl auf die Versuchsportionen als auch auf die Kontrollportionen (gekochten), doch ist bei letzteren der Verbrauch von Chamäleon merklich geringer. Das Nitrat vermag eine solche Wirkung nur in hohen Konzentrationen hervorzurufen. Bei Verdünnung kann man keinen Effekt in Anwesenheit einer Nitratlösung konstatieren. Einen merklichen Zuwachs im Verbrauch von $KMnO_4$ rief die Phosphatlösung herbei. Doch ist dieser Effekt viel schwächer im Vergleich zum Zuwachs des Oxydationspotentials in Anwesenheit von H_2O_2. Vergleicht man den Effekt, welchen das Phosphat in Abwesenheit von H_2O_2 hervorruft, mit dem Effekt, welchen dasselbe Salz in Gegenwart von H_2O_2 auszuüben vermag, so sieht man, daß in diesem Falle der Effekt zweimal größer ist. So war in Gegenwart von H_2O_2, aber ohne Phosphat der Verbrauch von $KMnO_4$ für aktive Portionen 20,9 ccm; für entsprechende inaktive Portionen wurden 0,45 ccm $KMnO_4$ verbraucht; also ist der Mehrverbrauch für die aktive Portion gleich 20,45 ccm $KMnO_4$. In Gegenwart von Phosphat und von H_2O_2 wurden für die aktive Portion

31,75 ccm $KMnO_4$ verbraucht und für die inaktive — 0,75 ccm, also ein Unterschied von 31 ccm $KMnO_4$. Die Beigabe von Phosphat rief einen Mehrverbrauch an $KMnO_4$ in einer Menge von 10,55 ccm hervor. Fehlt im Reaktionsgemisch H_2O_2, so ist der Unterschied im Verbrauch von $KMnO_4$ zwischen der Portion mit Phosphat und der Portion ohne Phosphat 5,4 ccm. Dieselbe Berechnung für n/20 Nitrate zeigt einen Zuwachs des verbrauchten $KMnO_4$ in Anwesenheit von H_2O_2 im Reaktionsgemisch, die in einer Zahl von 14,2 ccm ausgedrückt wird, bei Abwesenheit von H_2O_2 reduziert sich diese Zahl auf 0,2 ccm. Also vermag das Phosphat, zum Unterschied von allen anderen untersuchten Salzen, die Oxydation des Pyrogallols nicht nur in einem vollständigen System *Peroxydase* + H_2O_2, sondern auch in Abwesenheit von H_2O_2 zu erhöhen. Wir denken, daß die erhöhte Oxydationsfähigkeit des Auszuges in Anwesenheit von Sauerstoff enthaltenden Salzen durch Anwesenheit eines Gemisches von Fermenten, unter welchen auch die Reduktase sich befindet, zu erklären ist. Dabei stellten wir uns vor, daß die Reduktase eine Reduktion der Verbindungen, die verschiedene Oxydationsstufen aufweisen, also auch der sauerstoffhaltigen Salze herbeiführt, in diesem Prozeß kann das Pyrogallol als Akzeptor des Sauerstoffs fungieren, wobei es zu Purpurogallin oxydiert wird. Nach *Bach* und *Tscherniak*[1]) enthält ein sorgfältig gereinigtes Präparat von Peroxydase, welches aus 130 kg Rohmaterial in einer Menge von 1 g erhalten wurde, in seiner Asche außer Metallelementen noch Phosphor.

Wir sehen also, daß die Elemente, die an der Zusammensetzung der Asche teilnehmen, außer Kalium[2]), stimulierend auf das Oxydationspotential des Systems *Peroxydase* + H_2O_2 einwirken. Es ist schwer zu sagen, wodurch eine Wirkung der Aschenelemente bedingt wird. Die Wirkung der Salze kann äußerst kompliziert sein. Die Salze können auch die übrigen Komponenten des Auszuges beeinflussen, indem sie die chemisch-physiologischen Bedingungen des Außenmediums ändern; diese Änderungen üben aber ihrerseits eine Wirkung auf die Arbeit des Ferments aus. Wir hatten uns die Aufgabe gestellt, wie dieses schon erwähnt wurde, nicht die unmittelbare Wirkung von Salzen auf das Ferment zu untersuchen, wir wollten vielmehr die Einwirkung von Salzen auf das komplizierte Medium, in welchem das Ferment im Wasserauszug zu arbeiten pflegt, aufklären. Beim physiologischen Studium der Fermente müssen wir die Bedingungen, in denen die fermentative Arbeit in den Organismen verläuft, berücksichtigen. Umgekehrt wäre der Fall beim chemisch-physikalischen Studium der Fermente, hier mußten wir isolierte Fermente und ihre Wirkung untersuchen[3]). Wenn das Ferment im Wasserauszug seine Arbeit ausübt, so erinnern diese Bedingungen mehr an die Verhältnisse der lebenden Zelle als die Bedingungen, in denen das Ferment bei seiner Isolierung von anderen Komponenten zu arbeiten gezwungen wird.

Zusammenfassung.

In unserer Arbeit wurde die Wirkung neutraler Salze auf die Peroxydasearbeit im Wasserauszug aus Weizensamen bei gleicher Wasserstoffionenkonzentration untersucht. Als oxydierbares Substrat

[1]) *A. Bach* und *Tscherniak*, Ber. d. chem. Ges. **41**, 2345, 1908.

[2]) *Willstätter* und *Stoll* finden kein Kalium in der Asche von Peroxydase

[3]) *R. Kuhn* und *C. Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen Lief. I, S. 92 bis 94. Leipzig 1924.

diente Pyrogallol; die Oxydationsenergie wurde nach der Menge des gebildeten Purpurogallins gemessen.

Die Bestimmung der Aktivität des Auszuges bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration ($H^{\cdot}$) zeigte, daß die *Peroxydase nur in einem bestimmten Intervall der Reaktion zu arbeiten vermag.* Von der sauren Seite stellt die Peroxydase ihre Arbeit bei einer Konzentration von p_H 3,5 ein, die besten Bedingungen für die Peroxydasearbeit liegen bei einer Konzentration von p_H 8,8. Bei wachsender Alkalität konnten wir nicht die Konzentrationsgrenze feststellen, bei der die Peroxydasearbeit aufhört; doch stellten wir fest, daß die Kurve bei Änderung der Konzentration im Sinne wachsender Alkalität vom Maximum in der Richtung der zunehmenden Alkalität rascher fällt als in der entgegengesetzten Richtung.

Die Untersuchung der Chloride zeigte, daß die Natur der Kationen den Charakter der Salzwirkung auf die Peroxydase bestimmt. *Erdalkalimetalle bewirken einen positiven Einfluß auf die Peroxydasearbeit, wobei mit wachsendem Atomgewicht des Kations auch der Effekt der Salzwirkung auf die Peroxydase wächst.* Das Mg, welches in seinen chemischen Eigenschaften von den übrigen Elementen seiner Gruppe etwas abweicht, zeigte auch im Vergleich zu anderen Elementen der Erdalkaligruppe zur Peroxydase ein anderes Verhalten. So änderte sich seine positive Wirkung auf die Peroxydase bei Verdünnung sehr schnell und schlug sogar bei steigender Verdünnung in eine hemmende um. Das scheint in einem Zusammenhang mit den hydrolytischen Eigenschaften seiner Salze zu stehen. Die Chloride der Erdalkalien: Ca, Sr und Ba, die in chemischer Beziehung nahe zueinander stehen, übten auf die Peroxydasearbeit fast die gleiche Wirkung aus. Geringe Unterschiede in ihrer Wirkung stehen im Einklang mit den Unterschieden in ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften. Die Wirkung dieser Salze wird bei starken Verdünnungen wahrgenommen, so übt das $CaCl_2$ bei einer Konzentration von n/8000, $SrCl_2$ und $BaCl_2$ bei einer Konzentration von n/40000 eine ausgesprochene Wirkung aus. Für $CaCl_2$ ist eine ausgedehnte Zone der maximalen Wirkung charakteristisch (n/80 bis n/800). Für Strontium haben wir das Maximum bei n/8000 und für Barium bei n/800. Eine maximale Erhöhung der Aktivität der Peroxydase ruft das $BaCl_2$ hervor. Die Eigenschaft der Fermente, unter dem Einfluß stark verdünnter Salzlösungen ihre Aktivität zu ändern, hat physiologisch eine große Bedeutung, denn gerade in der lebenden Zelle finden wir ähnliche Salzkonzentrationen. *Die Wirkung von Salzen dieser Elemente bei der Oxydation von Pyrogallol durch das System Peroxydase + H_2O_2 scheint auf ihrem Einfluß auf die Peroxydase selbst zu beruhen*; daß die Salze nicht auf das Substrat selbst oder auf das primäre Peroxyd (H_2O_2) einwirken, geht aus den

Versuchen mit $Fe^{\cdot\cdot} + H_2O_2$ hervor; bei diesen Versuchen zeigte es sich, daß die Gegenwart solcher Salze das Oxydationspotential dieses Systems zu erhöhen nicht imstande war.

Das Zink und das Quecksilber weichen in ihrer Wirkung von den übrigen Elementen der Gruppe noch stärker als das Mg ab. Das Zinkchlorid übte auf die Peroxydasearbeit eine hemmende Wirkung aus, das konnte mit seiner koagulierenden Wirkung zusammenhängen; bei der Koagulation von Kolloiden konnte die Peroxydase adsorbiert werden; auch konnte hier die Ansäuerung der Reaktion durch $ZnCl_2$ eine Rolle spielen.

Auf das Oxydationssystem $Fe^{\cdot\cdot} + H_2O_2$ übte das Zink keine solche Wirkung aus. Inaktivierte Portionen des Wasserauszuges besaßen in Gegenwart von $ZnCl_2$ stärkere oxydierende Eigenschaften als die Kontrollportionen ohne $ZnCl_2$. Der Effekt der Zugabe von $ZnCl_2$, ebenso wie der Effekt von $CaCl_2$, $SrCl_2$ und $BaCl_2$ wird durch die Wirkung von Salzen auf die Peroxydase selbst und nicht durch die Wirkung auf das Substrat und auf H_2O_2 hervorgerufen. Das Sublimat, welches nur in starken Verdünnungen verwertet wurde, übte nur eine kaum merkliche Hemmung auf die Peroxydase aus; dieses wurde bei derselben Konzentration beobachtet, bei welcher $ZnCl_2$ die Aktivität von Peroxydase bis auf 30 Proz. herabsetzte. Bei sehr starker Verdünnung (1 n . 10^{-7}) fing das Sublimat an, eine stimulierende Wirkung auszuüben (Erhöhung der Aktivität von Peroxydase auf 9,5 Proz.).

Die Gruppe der Alkalichloride kann im ganzen als eine Gruppe, die eine Hemmung der Peroxydase hervorruft, charakterisiert werden. Nur das Li wie das Mg, die auch chemisch von anderen Elementen ihrer Gruppe abweichen, übten eine besondere Wirkung auf Peroxydase aus. Bei hoher Konzentration (n/20) wirkte das Li wie ein Stimulator, doch verlor es diese Eigenschaft sehr schnell bei Verdünnung bis n/100. Das Natrium-, Kalium- und Rubidiumchlorid riefen eine fast gleiche Wirkung hervor, dabei besitzen die K- und Rb-Salze die Eigenschaft, ihre Wirkung bei starker Verdünnung dauernder festzuhalten als das Natrium. Das Ammoniumchlorid übt eine kaum merkliche Wirkung aus. Im ganzen ist *die Veränderung des Oxydationspotentials des Systems Peroxydase + H_2O_2 unter dem Einfluß der Alkalichloride viel schwächer als die entgegengesetzte Wirkung der Erdalkalichloride.*

Sind im Reaktionsgemisch zwei einseitig wirkende Erdalkalichloride zugegen, so bewirken diese Salze eine solche Veränderung des Oxydationspotentials des Systems *Peroxydase + H_2O_2*, die der Summe der Veränderungen dieses Potentials unter dem Einfluß jedes einzelnen Chlorids gleichkommt. Anders ausgedrückt, *besitzt die Salzmischung einseitig wirkender Chloride additive Eigenschaften. Entgegengesetzt wirkende Chloride üben bei gleichzeitiger Anwesenheit keine summarische*

Wirkung aus. Die Kompensationswirkung des stärkeren Komponenten des Salzgemisches prävaliert in diesem Falle, und zwar desto mehr, je enger das Verhältnis der einzelnen Komponenten im Gemisch ist. Was die Kationen anderer Gruppen anbetrifft, so wurden noch $Mn^{\cdot\cdot}$ und $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$ untersucht. Das als Chlorid angewandte Mn übte auf die Aktivität von Peroxydase eine ausschließlich hemmende Wirkung aus; bei Verdünnung nahm diese hemmende Wirkung zu. Ebenso wie dieses bei $MgCl_2$ der Fall war, ist diese Wirkung von $MnCl_2$ mit der Bildung eines wenig dissoziierten Hydrats verbunden; dadurch nehmen im Reaktionsgemisch die hemmenden Cl-Ionen überhand.

In den inaktivierten Portionen wurde das Oxydationspotential durch $Mn^{\cdot\cdot}$ und $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$ verstärkt, wie das auch bei $ZnCl_2$ der Fall war. In beiden Fällen kann man solch eine Erhöhung des Oxydationspotentials rein chemisch dadurch erklären, daß diese Metalle geringe Mengen von Peroxydverbindungen bilden.

Die Wirkung des Eisenoxyds in Form des weinsauren Salzes äußerte sich in einer Erhöhung der Aktivität von Peroxydase, doch war diese Oxydationssteigerung geringer als diejenige, welche durch Erdalkalichloride verursacht wird. *Die Mn- und Fe-Salze, die selbst einen Oxydationseffekt in Gegenwart von Hydroperoxyd bewirken, können nicht die Wirkung der biologischen Katalysatoren der Oxydation merklich erhöhen.*

Die Untersuchung von Salzen der Anionenreihe zeigte, daß diese Salze nur in ziemlich hohen Konzentrationen auf die Peroxydase eine Wirkung auszuüben vermögen. Bei Verdünnung büßen diese Salze rasch ihre Wirkung ein. Das Phosphat rief eine Erhöhung des Oxydationspotentials des Wasserauszuges auch in Abwesenheit von H_2O_2 hervor, das zeigt, daß im Reaktionsgemisch Peroxydverbindungen unter dem Einfluß von Phosphat gebildet werden. In Abwesenheit von Phosphat und H_2O_2 bleibt der Auszug inaktiv. Die positive Wirkung des Nitrats sinkt bei Verdünnung rapid, daraus kann man schließen, daß es die ganzen Moleküle sind, die den aktiven Teil des Salzes bilden. Das Sulfat übte auch eine positive Wirkung auf Peroxydase aus, doch war dieselbe geringer als bei Nitrat und Phosphat. Die maximale Wirkung zeigte das Sulfat, wie auch Phosphat, bei einer Konzentration von n/80.

Die Elemente, die in der Asche der Peroxydase sich vorfinden (nach *Bach*, *Willstätter* und *Stoll*), bewirkten eine Aktivierung der Peroxydase im Wasserauszug aus Weizensamen. *Die regulierende Wirkung der Aschenbestandteile auf die Peroxydasearbeit muß unbedingt als eine wichtige physiologische Funktion dieser Elemente angesehen werden. Die Wirkung dieser Elemente äußert sich bei solchen Konzentrationen (das gilt besonders für die Gruppe der Erdalkalien), die leicht in einer lebenden Zelle realisiert werden können.*

Nephelometrische Untersuchungen über fermentative Eiweißspaltung.

III. Mitteilung:

Eine Methode zur Bestimmung der peptischen und tryptischen Verdauung von Casein.

Von

P. Rona und **H. Kleinmann.**

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin, Charité.)

(Eingegangen am 3. Dezember 1924.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

I.

In vorangehenden Arbeiten haben wir Versuche beschrieben, die wir über peptische Verdauung mittels der nephelometrischen Analyse angestellt hatten. Wir benutzten als Substrat nahezu völlig salzfrei dialysiertes Serumalbumin vom Pferde und bestimmten den Eiweißgehalt ungespaltener und peptisch gespaltener Substratverdünnungen durch Messung der Trübung, die durch Sulfosalicylsäurezusatz zu den Albuminlösungen unter bestimmten Bedingungen erzeugt werden. Diese Methode lieferte innerhalb der angegebenen Grenzen genaue Resultate und ermöglichte durch ihre Einfachheit die Anstellung längerer Versuchsreihen. Wir konnten mit ihr den Einfluß der Ionen auf die peptische Spaltung von Eiweißlösungen prüfen, und wir benutzen sie zurzeit zu Untersuchungen über Giftwirkung und Kinetik bei peptischen Prozessen.

Es war jedoch wünschenswert, ein Substrat der nephelometrischen Methode zugänglich zu machen, das gleichmäßig der peptischen wie der tryptischen Verdauung unterliegt. Hieraus ergab sich die Wahl des Caseins und die Notwendigkeit eines Verfahrens, das ebenso leicht und sicher wie beim Albumin die Verfolgung des Spaltungsvorgangs ermöglicht.

Die Fällung mit Sulfosalicylsäure bei stark saurer Reaktion, wie wir sie für die Bestimmung des Albumins verwandten, erwies sich für Casein als unbrauchbar, da die Sulfosalicylsäurefällung des Caseins

unter allen Bedingungen — variierte p_H usw. — zur Flockung neigt. Auch die meisten anderen bekannten Eiweißfällungsmittel, wie Phosphorwolframsäure, Ferrocyankalium, Phosphormolybdänsäure, Säurefällung an sich usw. eignen sich für Caseinlösungen nicht, da sie leicht ausflocken.

Da es sich erfahrungsgemäß herausgestellt hatte, daß die Neigung, stabile Trübungen zu bilden, mit der Größe des Moleküls wächst, erprobten wir Eiweißfällungen mit verschiedenen Alkaloiden unter variierenden Bedingungen. Am aussichtsreichsten zeigte sich die erzielte Fällung bzw. Trübung bei der Gruppe der Chininalkaloide. Die verschiedenen Vertreter dieser Gruppe, wie Chinin, Chinidin, Vuzin, Eucupin usw., wurden in Form ihrer verschiedenen Salze durchprobiert. Die stabilsten Trübungen — und auch die empfindlichsten — schien uns das Chinidin (hydrochloricum) zu liefern, das wir als Trübungsreagens für Caseinlösungen ausarbeiteten. Die erzielten Resultate werden unter II. beschrieben.

Als Nephelometer verwandten wir das Nephelometer der Firma F. Schmidt u. Haensch (Berlin).

II. Die Methode der Caseinbestimmung mittels Chinidintrübung.

Für alle Untersuchungen wurde folgende Caseinlösung benutzt.

2,5 g Casein *Hammarsten* werden mit 10 bis 20 ccm H_2O angerührt und mit 50 ccm n/2 Natriumacetatlösung versetzt. Diese wird am einfachsten durch Vermischen von 25 ccm n NaOH und 25 ccm n CH_3COOH erhalten. Die Lösung wird leicht erwärmt (40° C), bis sich das Casein völlig gelöst hat, wozu einige Zeit und leichtes Rühren notwendig ist, und dann auf 1 Liter mit H_2O verdünnt und unter Toluolzusatz aufgehoben. Die Lösung ist fast klar, nur ganz leicht opaleszierend. Das p_H der Lösung ist 5,97.

Diese Lösung ist also 0,25proz. an Casein und n/40 an Natriumacetat. (Der Acetatzusatz ist notwendig zur Lösung des Caseins.)

Für Fermentversuche, bei denen die Spaltung gewöhnlich bis zu 50 bis 70 Proz. durchgeführt wurde, wurden 6 ccm der Caseinlösung in 25 ccm Volumen verwandt und 5 ccm zur Analyse benutzt.

Es genügen also zur Erzielung einer guten (starken) Trübung 3 mg Casein. Aber auch Mengen von 1 mg und darunter sind der Analyse gut zugänglich. Bei Anwendung der Mikrogefäße ist die notwendige Menge um das Achtfache kleiner, so daß als untere Grenze der Methode etwa 0,1 mg Casein angegeben werden muß.

Diese Verdünnungen der angegebenen Caseinlösung sind praktisch völlig klar. Eine Eigentrübung der Caseinlösung kommt für die Messungen nicht in Frage.

Als Reagens diente eine gesättigte Lösung von Chinidinum hydrochloricum (Vereinigte Chininfabriken Zimmer & Co., Frankfurt a. M.)[1].

[1]) Der Firma Zimmer & Co., Frankfurt a. M., die uns freundlichst zu den Versuchen Chinidin zur Verfügung stellte, sei an dieser Stelle unser Dank ausgesprochen.

Da Chinidinum hydrochloricum sich nur sehr langsam löst, die Lösung aber sicher vollkommen gesättigt sein muß (s. weiter unten Einfluß der Reagenzmenge), so wird in etwa 1 Liter kochenden destillierten Wassers so lange Chinidinum hydrochloricum eingetragen, bis sich nichts mehr löst, dann ein größerer Überschuß als Bodenkörper hinzugegeben und die Lösung etwa $^1/_2$ Stunde im Wasserbade bei 100° gehalten. Die erkaltete Lösung wird stets in Berührung mit dem Bodenkörper belassen. Sie muß zum Auskristallisieren mindestens 24 Stunden vor Gebrauch gestanden haben. Auch dann ist darauf zu achten, ob nicht noch Chinidin auskristallisiert. Von dieser Lösung wird zum Gebrauch eine kleinere Menge frisch abfiltriert.

Der weiter unten beschriebene angewandte Puffer ist eine Phosphatlösung, bestehend aus 9 Volumenteilen m/15 sekundären Natriumphosphats und 1 Volumenteil m/15 primären Kaliumphosphats (p_H^- etwa 7,8).

Die Caseinlösung gibt bei Zugabe des Chinidinreagens eine völlig homogene und (s. weiter unten) haltbare Trübung.

Diese Trübung ist aber nur innerhalb bestimmter Grenzen und unter bestimmten Bedingungen als zur Messung geeignet zu bezeichnen. Da Casein innerhalb eines bestimmten Aciditätsbereichs Eigentrübung zeigt, die Chinidintrübung an sich ebenfalls von der Acidität abhängig ist, Salzzusätze, Zeitdauer usw. eine Rolle spielen, mußten die Messungsbedingungen genau festgelegt werden.

Über die Methodik der Nephelometrie muß auf die entsprechenden Abhandlungen verwiesen werden (4) (5).

a) *Einfluß der Zeit auf die Trübung.*

Je 2, 4 und 6 ccm einer Verdünnung der Caseinstammlösung mit aqua dest. 1 : 5 wurden mit ausreichender Reagenzmenge versetzt und mit aqua dest. auf 20 ccm aufgefüllt.

Nach Zusatz des Reagens beginnt nach einigen Sekunden eine Trübung aufzutreten, die in 5 bis 10 Minuten ihren Höhepunkt erreicht und dann stehenbleibt. Die Dauer der Trübungsstabilität wurde im Nephelometer bestimmt.

Als Vergleich diente der früher beschriebene feste Trübungsstandard, dessen Farbe auf die Chinidintrübung genau eingestellt und dessen Helligkeit mittels des Nephelometerfensters derart reguliert wurde, daß sie gleich der auf 25 gebrachten untersuchten Lösung war.

Tabelle 1.

Einfluß der Zeit auf die Trübung.

Nr.	1	2	3	4
Caseinlösung in ccm	2	4	6	6
Nephelometrische Ablesung nach 10 Min. . .	25,0	25,0	25,0	25,0
„ „ „ 20 „ . .	25,0	25,0	25,0	25,0
„ „ „ 30 „ . .	25,0	25,0	25,0	25,0
„ „ „ 40 „ . .	25,0	25,0	25,0	25,0
„ „ „ 50 „ . .	25,0	27,2	25,0	25,0
„ „ „ 60 „ . .	25,0	29,0	28,4	flockt

Gemessen gegen konstanten Trübungsstandard.

Wie die Tabelle I zeigt, halten sich die Trübungen 40 bis 60 Minuten konstant. Diese Zeit reicht völlig zur bequemen Messung.

Nach Zugabe des Reagens ist also 10 Minuten zu warten und dann innerhalb von etwa $^3/_4$ Stunden die Messung vorzunehmen.

b) Einfluß der Reagenzmenge auf die Trübung.

Als maximal zu messende Trübung können etwa 6 ccm einer Verdünnung 1 : 5 der Stammlösung angesehen werden.

Um die für diese Menge ausreichende Reagenzmenge zu bestimmen, wurden zu je 6 ccm Caseinlösung wachsende Reagenzmengen bei einem Gesamtvolumen von 20 ccm gegeben und die Trübungsstärke gegen den Trübungsstandard bestimmt.

Tabelle II.

Einfluß der Reagenzmenge.

Nr.	1	2	3	4	5	6
Chinidinlösung	5 ccm 1 Proz.	5 ccm 2 Proz.	1 ccm gesättigt	2 ccm gesättigt	4 ccm gesättigt	8 ccm gesättigt
Caseinlösung in ccm . .	6	6	6	6	6	6
Trübungsstärke	wachsend ⟶				konstant	

Es zeigte sich von etwa 4 ccm Reagens an Trübungskonstanz.

Wir verwendeten daher für alle Analysen 5 ccm gesättigter Chinidinlösung bei 20 ccm Gesamtvolumen.

c) Einfluß der Acidität auf die Chinidintrübung.

Die Acidität der Lösung ist für die Chinidintrübung sowohl hinsichtlich ihrer Stärke als auch ihrer Stabilität sehr wesentlich. Vor allem geben Caseinlösungen bei bestimmten Aciditäten Eigentrübungen, die auf einer Säurefällung des Caseins in der Gegend seines isoelektrischen Punktes beruhen.

Tabelle III.

Einfluß des Essigsäurezusatzes auf die Caseinlösung.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Caseinlösung in ccm .	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Essigsäure in ccm . .	0,93	1,87	0,375	0,75	1,5	3	6	1,2	2,4
	n/100 flockt				n/10 opaleszent			1 n sehr schwach opaleszent	

Die Tabelle III veranschaulicht das Verhalten unserer Caseinlösung (1 : 5) bei Zusatz verschiedener Essigsäuremengen. Die klare Lösung wird trübe, flockt, um bei weiterem Säurezusatz wieder klar zu werden. Der Bereich,

innerhalb dessen Säuretrübungen auftreten, liegt rund zwischen einem p_H von 5,5 bis 3,5. Innerhalb dieses Bereichs ist also die Trübungsreaktion unmöglich.

Bei saurer Reaktion (etwa p_H 2) tritt bei Zugabe von Chinidin überhaupt keine Trübung mehr auf. Bei stärkerer alkalischer Reaktion (etwa von 8 an) wird die Chinidinbase aus dem salzsauren Salz frei und fällt aus. Es bleibt also für Trübungsreaktion nur ein Gebiet zwischen etwa p_H 8 bis 5,5.

Aber auch innerhalb dieses Gebietes ist die Reaktion nicht gleichgültig.

Tabelle IV.

Einwirkung des p_H auf die Chinidin-Eiweißtrübung. Kolben 1 bis 3 Phosphatpuffer, 4 ohne Puffer.

Nr.	1			2			3			4	
p_H	7,52			6,92			6,11			6,23	
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b
Nephelometrische Ablesung	8,3	8,0	8,0	10,7	10,5	10,7	19,9	20,0	20,0	20,0	19,6
	8,1	7,8	8,1	10,6	10,4	10,5	20,0	20,1	20,1	20,0	20,2
	8,2	7,9	8,2	10,7	10,5	10,5	20,1	19,9	19,9	20,0	19,9
Durchschnitt	8,1			10,5			20,0			19,9	
Verglichen mit . . .	4 = 20			4 = 20			4 = 20			4 = 20	
Trübung in Proz. . .	227			190			100			100	

Tabelle IV zeigt die Abhängigkeit der Trübungsstärke von der Reaktion. Die Trübung wird nach der sauren Seite hin auch unstabiler.

Am geeignetsten für die Reaktion zeigte sich annähernd neutrale Reaktion (p_H 7,6 bis 7,8).

Auf jeden Fall müssen die Trübungen, die verglichen werden, unbedingt gleiche Acidität besitzen. Um diese stets zu gewährleisten, haben wir einen Pufferzusatz zu den Trübungen eingeführt. Derselbe besteht aus einer Mischung von 9 Volumenteilen m/15 sekundären Natriumphosphats und 1 Volumenteil m/15 primären Kaliumphosphats. Von diesem Puffer werden jeder Trübungsreaktion 5 ccm (bei einem Endvolumen von 20 ccm) zugesetzt. Das p_H dieser Lösungen beträgt etwa 7,6 bis 7,8.

d) Einfluß des Volumens bei Reagenzzusatz auf die Trübung.

Bei früheren Arbeiten hatte es sich gezeigt, daß das Volumen der Lösung, bei dem das Reagens zugesetzt wird, von Bedeutung für die Stärke und Stabilität der Trübung sein kann. Es wurden daher Versuche angestellt, ob Trübungen, bei denen 5 ccm Chinidinlösung zu 5 ccm Caseinlösung gegeben und die dann auf 20 ccm mit Wasser gebracht wurden, gleich sind solchen Trübungen, bei denen zuerst das Wasser und dann das Chinidin zugegeben wurde.

Tabelle V.

Einfluß des Volumens bei Reagenzzusatz auf die Trübung.

Versuchsanordnung	5 ccm Caseinlösung + 5 ccm Chinidinlösung + dest. Wasser ad 20 ccm		5 ccm Caseinlösung + dest. Wasser ad 15 ccm + 5 ccm Chinidinlösung	
	a	b	a	b
Nephelometrische Ablesung	20,0 20,0 20,0	20,1 20,0 20,1	19,7 19,4 19,5	19,5 19,5 19,5
Durchschnitt	20,0		19,5	
Verglichen mit . . .	Ia = 20,0		Ia = 20	
Abweichung in Proz.	0		2,5	

Tabelle V zeigt, daß die Trübungen innerhalb der Fehlergrenzen gleich sind. Das Volumen hat innerhalb der untersuchten Grenzen keinen Einfluß.

e) Versuche über Reproduzierbarkeit der Trübung.

Ein Beispiel von zahlreichen in dieser Richtung angestellten Versuchen gibt Tabelle VI.

Tabelle VI.

Reproduzierbarkeit der Trübung.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	40,0 40,1 40,1	40,5 40,6 40,6	39,3 39,4 39,5	40,2 40,2 40,2	40,2 40,2 40,0	42,1 42,0 42,0	39,6 39,6 39,7	40,0 40,0 40,0	41,1 41,3 41,4	39,7 39,6 39,8
Durchschnitt . .	40,1	40,6	39,4	40,2	40,1	42,2	39,6	40,0	41,3	39,7
Verglichen mit .	11 = 40									
Fehler in Proz. .	+ 0,2	+ 1,5	— 1,5	+ 0,5	+ 0,25	+ 5,5	— 1,0	0,0	+ 3,3	- 0,75

Diese Tabelle zeigt das typische Verhalten der Casein-Chinidintrübung. Die Trübungen treten fast immer in gleicher Stärke auf, die Schwankungen sind im allgemeinen sehr gering, unter 1 Proz. Daneben treten aber, wie bei Nr. 6, einzelne Ausfälle auf. Diese sind nicht völlig aus dem Rahmen der Messung fallend (wie bei der Ca-Trübung), sondern differieren etwa um 3 bis 5 Proz. Diese Ausfälle sind nicht häufig, bedingen aber die stete Anwendung von Parallelwerten zur Messung. Sie machen die Casein-Chinidintrübung nicht so absolut zuverlässig, wie es die Sulfosalicyltrübung des Albumins ist. Trotzdem liefert bei Beachtung der Möglichkeit solcher Ausfälle die Chinidintrübung durchaus befriedigende Resultate.

f) Über den Einfluß von Elektrolyten auf die Trübung.

Zum Studium des Einflusses von Salzen auf die Trübung wurden Caseinlösungen (5 ccm 1 : 5) mit Salzlösungen versetzt, derart, daß ihr Gehalt n/2 an NaCl, n/1 an Natriumacetat und n/2 an Natriumsulfat war, und gegen nicht salzhaltige verglichen.

Tabelle VII. Salzwirkung auf die Chinidintrübung.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	
Zusatz 10 ccm	Dest. Wasser				1 n NaCl	2 n Kaliumacetat	1 n Na_2SO_4	
Nephelometr. Ablesung	20 20 20	20,5 20,3 20,5	20,6 20,6 20,7	20,5 20,7 20,5	auskristallisiert	stark milchig getrübt	13,2 13,2 13,1	12,3 12,0 12,3
Durchschnitt .	20,0	20,4	20,6	20,6	—	—	12,6	
Verglichen mit	1 = 20							
Abweichung in Proz.	0	2	3	3	—	—	23	

Tabelle VII zeigt, daß bei diesem Salzgehalt die Messungen unmöglich werden (Lösungen flocken) oder ganz abweichende Resultate geben.

Tabelle VIII. Salzwirkung (NaCl) auf die Chinidintrübung.
2 ccm Casein (1 : 2000) + 5 ccm (gesättigte) Chinidinlösung + Salzlösung + Aqua ad 20 ccm.

Nr.	1		2		3		4		5		6	
NaCl	0		n/2		n/4		n/8		n/16		n/32	
Nephelometr. Ablesung	20,0	20,0	23,5	18,0	14,9	14,5	16,2	16,2	17,1	18,2	20,6	20,3
	20,0	20,0	—	19,0	14,5	14,3	16,3	16,3	17,2	18,2	20,5	20,5
	20,0	20,0	leicht kristallin.		14,8	14,5	16,2	16,2	17,1	18,2	20,4	20,5
Durchschnitt .	20,0		—		14,3		16,2		17,6		20,5	
Verglichen mit	1 = 20											
Abweich. in Proz.	0		—		28,5		19,0		12,0		2	

Tabelle VIII zeigt Versuche, die Grenze zu bestimmen, bis zu der NaCl-Gehalt die Trübung stört. Der Gehalt der Lösungen an NaCl betrug absteigend n/2 bis n/32.

Wie die Versuche zeigen, stört der Salzgehalt bis zu einem Gehalt an Salz von n/32 die Trübung.

Tabelle IX. Salzwirkung (NaCl) auf die Chinidintrübung.
6 ccm Caseinlösung (1 : 2000) + 5 ccm (gesättigte) Chinidinlösung + Salzlösung ad 20 ccm.

Nr.	1		2		3		4	5	6	
NaCl	0		n/30		n/50		n/100	n/150	n/200	
Nephelometr. Ablesung	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	19,3	19,3	19,5	19,5
	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	19,2	19,2	19,5	19,5
	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	19,3	19,4	19,5	19,5
Durchschnitt .	20		20		20		19,3	19,3	19,5	
Verglichen mit	1 = 20									
Abweich. in Proz.	0		0		0		3,5	3,5	2,5	

Tabelle IX zeigt Versuche, mit dem Salzgehalt weiter hinunterzugehen (n/30 bis n/200). Es zeigt sich, daß ein Gehalt von etwa n/30 NaCl, berechnet auf das endgültige Trübungsvolumen von 20 ccm, die Trübung nicht mehr stört.

Tabelle X.

Salzwirkung (NaCl) auf die Chinidintrübung bei variierter Casein-konzentration. Endvolumen 20 ccm.

Nr.	I 1	I 2	II 1	II 2	III 1	III 2
Casein, ccm	4,0	4,0	5,0	5,0	6,0	6,0
NaCl, ccm	0	10,0 Endkonz. n/100 NaCl	0	10 Endkonz. n/100 NaCl	0	10 Endkonz. n/100NaCl
Nephelometr. Ablesung	20,0 19,8 — 19,5 — 19,7	20,0 20,1 20,0 20,2 20,0 20,0 20,2 20,0 20,0	16,1 16,1 16,5 16,1 16,3 16,1	16,2 16,2 16,2 16,2 16,2 16,2 16,2 16,2 16,2	13,2 13,3 13,1 13,3 13,1 13,3	13,4 13,2 13,2 13,0 13,3 13,0
Durchschnitt .	19,8	20,1	16,2	16,2	13,2	13,2
Verglichen mit	$I_1 = 20$	$I_1 = 20$	$I_1 = 20$	$I_1 = 20$	$I_1 = 13,2$	$III_1 = 13,2$
Caseinmengenverh.	1 : 1	1 : 1	4 : 5	4 : 5	2 : 3	2 : 3
Theoret. Wert	20	20	16	16	13,3	13,3
Abweichung in Proz.	1	0,5	1	1	0,5	0,5

Tabelle X zeigt Versuche, das Verhältnis verschiedener Caseintrübungen bei einer Salzkonzentration von n/100 NaCl festzustellen.

Es geht aus diesen hervor, daß der Salzgehalt das hier vorweggenommene Verhältnis der Proportionalität zwischen Konzentration und Trübung nicht stört.

Nachdem es sich also herausgestellt hatte, daß NaCl-Zusatz bis zu einer Konzentration von etwa n/30 nicht stört, wurde Na_2SO_4 und $CaCl_2$ bis zu einer Konzentration von n/30 erprobt.

Tabelle XI. Einwirkung von Na_2SO_4 und $CaCl_2$ auf die Trübung.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Salzgehalt		Na_2SO_4			$CaCl_2$		
	—	n/30	n/100	n/200	n/30	n/100	n/200
Nephelometr. Ablesung	21,0 21,0 21,0	21,4 21,4 21,0 21,0 21,0 21,0	22,2 21,2 22,2 21,9 22,2 21,9	21,9 22,1 21,9 22,1 21,9 22,1	40,0 40,0 40,0 40,0 40,0 40,0	32,8 31,4 32,8 31,4 32,8 31,4	25,0 25,0 25,0 25,0 25,0 25,0
Durchschnitt .	21,0	21,1	22,0	22,0	40,0	32,1	25,0
Verglichen mit	1 = 21						
Abweichung in Proz.	0	0,5	5	5	48	35	16

Tabelle XI zeigt, daß Na_2SO_4 ohne Einfluß auf die Trübung ist. Calciumsalze verändern die Trübung derart, daß sie nicht zugesetzt werden können.

Es folgt also aus diesen Versuchen, daß ein Salzgehalt bis etwa n/30 die Trübung nicht stört. Da es sich aber im Laufe der Versuche herausgestellt hat, daß Trübungen mit einem Salzgehalt, der dicht an dieser Grenze liegt, nicht stets zuverlässig sind, ist es ratsam, den Salzgehalt tunlichst nicht über n/40 ansteigen zu lassen. Calciumsalze dürfen nicht zugegen sein.

g) Verhältnis zwischen Trübungsstärke und Konzentration.

Caseinlösungen verschiedener Konzentration werden gegeneinander verglichen. Angewandt werden Konzentrationen von 0,5 ccm Caseinlösung bis 6 ccm.

Die Tabellen XII, XIII und XIV geben einen Auszug aus zahlreichen Versuchen.

Tabelle XII.

Proportionalität in der Chinidinmethode.

Nr.	1		2		3		4		5	6	7	
Caseinmenge in ccm	4,0		3,0		2,5		2,0		1,5	1,0	0,5	
Nephelometr. Ablesung	20,0	20,0	40,0	40,4	41,3	41,5	40,2	40,4	39,5	40,0	40,0	41,0
	20,0	20,0	40,2	40,2	41,2	41,1	40,0	40,6	39,0	39,9	40,0	40,7
	20,0	20,0	40,1	40,0	41,5	41,1	40,1	40,5	39,3	39,5	40,0	40,3
Durchschnitt .	20		40,1		41,3		40,3		39,3	39,8	40,5	
Verglichen mit	1 = 20		1 = 30		1 = 25		1 = 20		1 = 15	4 = 20	6 = 20	
Theoret. Wert	20		40		40		40		40	40	40	
Abweichung in Proz.	0		0,15		1,95		0,45		1,05	0,3	0,75	

Tabelle XIII.

Proportionalität in der Chinidinmethode.

Nr.	1		2		3		4		5	
Caseinmenge in ccm	3,0		2,0		1,5		1,0		0,5	
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	30,0	29,0	39,5	39,5	28,3	28,2	30,0	30,0
	20,0	20,0	30,0	29,0	39,2	39,3	28,3	28,3	30,0	30,0
	20,0	20,0	30,0	29,4	39,6	39,4	28,3	28,3	30,0	30,0
Durchschnitt	20		29,5		39,4		28,3		30,0	
Verglichen mit . . .	1 = 20		1 = 20		1 = 20		1 = 10		1 = 5	
Theoretischer Wert .	20		30		40		30		30	
Abweichung in Proz.	0		0		1,5		5,8		0	

Tabelle XIV.

Proportionalität in der Chinidinmethode.

Nr.	1				2				3	
Caseinmenge in ccm	6,0				4,0				5,0	
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b
Nephelometrische Ablesung		20,0	19,5	19,9	30,1	30,1	30,1	29,5	30,0	29,1
	20	20,0	19,7	20,0	30,1	30,1	30,1	29,0	30,0	29,0
		20,0	19,7	20,0	30,1	30,1	30,1	29,1	30,0	29,1
Durchschnitt	19,8				29,8				29,5	
Verglichen mit . . .	1a = 20				1 = 20				1 = 15	
Verhältnis der verglichenen Trübungen	1 : 1				2 : 3				1 : 2	
Abweichung in Proz.					0,6				1,5	

Die Tabelle XV gibt einen gleichen Versuch bei Anwesenheit von Pufferlösung, wie wir diese bei den späteren Fermentversuchen stets zugesetzt haben.

Tabelle XV.

Proportionalität bei Phosphatpufferzusatz.

Ausgangscaseinlösung: 6 ccm Caseinstammlösung + 10 ccm n/10 HCl, destilliertes Wasser zu 25 ccm.

Nr.	1		2		3	
Caseinlösung in ccm	2,5		4,0		5,0	
+ ccm $^1/_{25}$ NaOH	2,5		4,0		5,0	
Phosphatpuffer $^1/_{15}$ m. p_H 7,8	5,0		5,0		5,0	
Nephelometrische Ablesung . .	20,0	20,5 20,0 20,2	12,1 12,4 12,1	12,2 12,3 12,1	9,9 10,0 9,9	9,8 9,8 9,8
Durchschnitt	20		12,2		9,9	
Verglichen mit	1 = 20					
Verhältnis der Trübungen . . .	1 : 1		4,0 : 2,5		2 : 1	
Abweichung in Proz.	—		2,2		1	

Die Versuche zeigen, daß ebenso wie bei den früher beschriebenen Methoden das nephelometrische Gesetz gilt, daß Proportionalität zwischen Trübungsstärke und Konzentration besteht.

h) Fehlergröße der Methode.

Die Fehlergröße der Methode ist nicht ganz leicht anzugeben. Die meisten Versuche stimmen so gut überein, daß die Fehlergröße von 0,5 Proz. die der nephelometrischen Methodik eigen ist, nicht überschritten zu werden braucht. Daneben können aber immer wieder einzelne Abweichungen auftreten, wie z. B. bei Versuch 4 der Tabelle XIII ein Fehler von 5,8 Proz. Derartige Abweichungen können natürlich durch entsprechende Parallelversuche leicht vermieden werden und fallen gerade bei Fermentversuchen, für die die Methode geschaffen wurde, als aus der Kurvenlinie liegende Punkte sofort auf. Der durchschnittliche Fehler der in den Tabellen XII bis XV gegebenen Versuche beträgt 1,0 Proz. In rechter Annäherung beträgt der durchschnittliche Fehler der Methode 1 bis 2 Proz.

i) Besprechung der Versuche.

Überblicken wir die zur Ausarbeitung einer Methode der Caseinbestimmung mittels Chinidintrübung angestellten Versuche, so kommen wir zu folgenden Ergebnissen.

Caseinlösungen können schnell und genau bestimmt werden, wenn Lösungen von Casein, die in vorgeschriebener Weise bereitet werden, in Mengen von etwa 1 bis 5 mg Casein (0,1-mg-Mikronephelometer) gegen möglichst gleichkonzentrierte Lösungen unbekannten Gehaltes nephelometrisch gemessen werden.

Hierzu kommen zweckmäßig 1 bis 5 ccm der klaren Caseinlösung zu 5 ccm Phosphatpuffer (p_H 7,8); nach Zugabe von 5 ccm heiß gesättigter, erkalteter Chinidinum-hydrochloricum-Lösung wird die Lösung mit Wasser auf 20 ccm gebracht. Alle Lösungen müssen gut faserfrei filtriert sein.

Die Trübungen bleiben bis zur Messung etwa 10 Minuten stehen. sie halten sich dann etwa 3/4 Stunden konstant. 5 ccm Chinidinlösung reichen für die angegebenen Caseinmengen aus.

Das Volumen beim Reagenzzusatz spielt keine Rolle, die Trübungen sind beliebig oft gut reproduzierbar. Einzelne Ausfälle mit Abweichung von einigen Prozenten kommen vor. Daher soll in Parallelversuchen gearbeitet werden. Alle Trübungen sollen bei gleicher p_H verglichen werden, weshalb Anwendung des Puffers notwendig ist.

Konzentration und Trübungsstärke sind proportional.

Der Fehler der Methode beträgt etwa 1 bis 2 Proz. Die Lösungen vertragen Zusätze von Salzen ohne Störung bis etwa n/30. Calciumsalze dürfen nicht zugegen sein.

III. Anwendung der Methode auf das Studium peptischer Verdauung.

Bevor die Methode für das Studium der peptischen Verdauung nutzbar gemacht werden konnte, mußte festgestellt werden, ob die Spaltprodukte einen Einfluß auf die Trübung ausüben. Hierzu wurde eine Caseinlösung so stark peptisch gespalten (Methode s. unten), wie es bei Anwendung starker Pepsinkonzentrationen überhaupt möglich war. Die Spaltung ließ sich nicht so weit führen, daß mit Chinidin überhaupt keine Trübung mehr auftrat. Die Resttrübung der gespaltenen Lösung mit Chinidin blieb also zu berücksichtigen.

Zu 6 ccm Caseinlösung (1 : 5) wurden 0, 1,0, 4,0 und 6,0 ccm einer mit Pepsin bei einer p_H von etwa 2 gespaltenen und wieder genau neutralisierten Lösung von 6 ccm gleich starken Caseins in 25 ccm Vol. gegeben. Die Trübung der Lösungen wurde gegen die kein Spaltprodukt enthaltende gemessen. Die Eigentrübung des Spaltproduktes wurde derart bestimmt, daß 6 ccm desselben allein in 20 ccm Endvolumen gegen die Lösung IV des Versuchs (Casein + 6 ccm Spaltprodukt) gemessen wurde. Die Tabelle XVI zeigt den Versuch und gibt scheinbar das Resultat, daß die Spaltprodukte die Trübung beeinflussen, da selbst bei dem Abzug von 7 Proz. für die Resttrübung der Spaltproduktlösung die Lösung IV, die 6 ccm Spaltprodukt enthält, noch 15 − 7 = 8 Proz. von dem Wasserwert abweicht.

Verschiedene Beobachtungen machten es wahrscheinlich, daß die Abweichung nicht in einer Beeinflussung der Trübung durch Spaltprodukte, sondern in einer ungenauen Messung der schwachen Resttrübung der Spaltproduktlösung zu suchen war. Bei diesen schwachen Konzentrationen macht sich nämlich schon die Löslichkeit der Chinidin-Caseintrübung bemerkbar.

Tabelle XVI.

Einfluß der Spaltprodukte der peptischen Verdauung auf die Trübung.

Nr.	1		2		3		4		5	
Zusatz der Spaltprodukte in ccm	0		1		4		6		Eigentrübg. von 6 ccm Spaltprod.	
Nephelometrische Ablesung	20,0 20,0 20,0	19,8 20,0 20,0	19,3 19,5 19,4	19,3 19,3 19,3	18,0 17,8 17,8	17,8 17,8 17,8	17,1 16,9 16,9	17,1 17,0 16,9	14,4 14,6 14,5	14,2 14,2 14,1
Durchschnitt	20,0		19,3		17,9		17,0		14,3	
Verglichen mit . . .	1 = 20				20		20		4a = 1	
Abweichung in Proz.			3,5		10,5		15,0		Eigentrübung der Spaltprod. in 4 = 7,0 Proz. der Gesamttrübung	

Es wurde daher eine Caseintrübung, die genau so schwach hergestellt wurde, wie die Trübung der Spaltprodukte, einmal gegen die Vergleichslösung der Tabelle XVI direkt und einmal als Zusatztrübung zu einer der Vergleichslösung gleich starken Trübung gemessen. Es ergab sich, wie Tabelle XVII zeigt, daß die Trübung im zweiten Falle 180 Proz. (die erste gleich 100 angenommen) beträgt. Die Löslichkeit führt also bei so schwachen Trübungen zu Fehlern. In Tabelle XVIII ist die Eigentrübung der Spaltprodukte im Verhältnis der Tabelle XVII korrigiert.

Tabelle XVII. Einfluß der Spaltprodukte der peptischen Verdauung auf die Trübung. Größe der Eigentrübung der Spaltprodukte.

Nr.	1			2			3		
Zusammensetzung d. Lösungen	4 ccm Caseinlösg. 1:5 5 „ Pufferlösung 5 „ Chinidinlösung 6 „ dest. Wasser			6 ccm Caseinlsg. 1:80 5 „ Pufferlösung 5 „ Chinidinlösung 4 „ dest. Wasser			6 ccm Caseinlsg. 1:80 4 „ „ 1:5 5 „ Chinidinlösung 5 „ Pufferlösung		
Nephelometrische Ablesung	20,0 20,0 20,0	20,1 19,8 19,8	19,8 19,9 19,8	26,0 26,2 26,1	26,0 26,2 26,2	26,1 26,1 26,1	17,0 17,0 17,1	17,2 17,3 16,9	17,2 17,2 16,9
Durchschnitt	19,8			26,1			17,1		
Verglichen mit . . .	1a = 20			1a = 2			1a = 20		
Gegen 1 gemessene Eiweißmenge in Proz.				7,7			14,5		

Tabelle XVIII. Korrekturwerte der Tabelle XVI.

Korrektur der Eigentrübung nach Tabelle XVII (14,5 : 7,7) = 188 Proz.			
	Für Versuch 4 = 6 ccm Spaltprodukt	Für Versuch 3 = 4 ccm Spaltprodukt	Für Versuch 2 = 1 ccm Spaltprodukt
Eigentrübung	7 Proz.	4,7 Proz.	1,17 Proz.
Korrigierte Eigentrübung .	13,2 Proz.	9,0 Proz.	2,2 Proz.
Beobachtete Abweichung .	15,0 Proz.	10,5 Proz.	3,5 Proz.
Restierender Fehler . . .	1,8 Proz.	1,5 Proz.	1,3 Proz.

Es zeigt sich also, daß dann die Lösungen, die Spaltprodukte enthalten, nicht mehr als der Methodenfehler erlaubt vom Vergleichswerte abweichen.

Da diese Versuche nur den Einfluß von Spaltprodukten in einer Menge messen, wie sie bei einer Spaltung bis etwa 25 Proz. entstehen (es wurden 6 ccm einer auf 25 ccm verdünnten gleichartigen, gespaltenen Caseinlösung zugesetzt), so wurden auch Versuche mit Spaltprodukten, die 50 Proz. Spaltung entsprechen, angestellt. Hierzu wurden 5 ccm doppelt so starker, als dem Versuch entspräche, gespaltener Caseinlösung (Endvolumen 20 ccm) zugesetzt. 5 ccm entsprechen 50 Proz. Spaltung. Da durch den Gehalt dieser zugesetzten Lösungen an Acetat und den bei der Neutralisation nach der Spaltung entstehenden Salzen ein Salzfehler der Trübung unvermeidlich ist, wurden Kontrollversuche, die den gleichen Salzgehalt und die gleiche Resttrübung wie die gespaltene Caseinlösung hatten, angestellt und untersucht, ob die Versuche, die außerdem noch die Spaltprodukte enthalten, von den genannten Kontrollversuchen abweichen. Tabelle XIX zeigt diese Versuche. Spalte I gibt den Wasserwert, Spalte II die Korrektur der Resttrübung, Spalte III den Einfluß der Salze, Spalte IV den Einfluß von Salzen, Resttrübungen und Spaltprodukten. Die Spaltprodukte enthaltenden Lösungen weichen von den Kontrollen nicht mehr als um 1,5 Proz. ab. Ein gleicher Versuch mit entsprechendem Ergebnis wurde auch mit 100 Proz. Spaltung entsprechender Menge Spaltprodukt angestellt.

Die Spaltprodukte sind also ohne Einfluß auf die Trübung.

Tabelle XIX.

Zusatz peptischer Spaltprodukte entsprechend einer Spaltung von 50 Proz.

Nr.	1			2			3			4		
Zusammensetzung der Lösung	5 ccm Casein 5 „ dest. Wasser 5 „ Puffer 5 „ Chinidinlsg.			5 ccm Casein 5 „ vgl. Trübung 5 „ Puffer 5 „ Chinidinlsg.			5 ccm Casein 5 „ Spaltprod. 5 „ Puffer 5 „ Chinidinlsg.			5 ccm Casein 5 „ Salzlösung 5 „ Puffer 5 „ Chinidinlsg.		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Nephelometrische Ablesung	20,0	19,9	20,1	17,7	17,7	17,9	21,4	22,3	22,2	24,1	24,5	24,4
	20,0	19,9	19,9	17,9	17,9	17,9	21,5	22,1	22,3	24,5	24,5	24,1
	20,0	20,0	20,0	17,8	17,8	17,9	21,7	22,2	22,2	24,5	24,3	24,4
Durchschnitt .	19,8			17,9			21,9			24,3		
Verglichen mit.	1a = 20											
Theoret. Wert .	20			20			20			20		
Abweichung in Proz.	1			+ 10,5			— 9,5			— 21,5		
Gesamtkorrektur .							— 20,0					

Was die Methode der Untersuchung der Fermentspaltung betrifft, so entspricht dieselbe völlig der in früheren Arbeiten geschilderten Methode, auf die verwiesen wird (1) (2). Sie sei in Anlehnung an die dort gegebenen Beschreibungen kurz skizziert.

Zu den Versuchen kommen in Reagenzgläsern je 6 ccm Caseinstammlösung. Hierzu wird HCl-Lösung gegeben in einer empirisch erprobten Menge und Stärke, derart daß die gewünschte Acidität erreicht wird.

Rechnerisch läßt sich die Menge nicht ermitteln, da der Acetatgehalt der Caseinlösung die Säure abstumpft. Zur Erzielung einer p_H von 1,87 werden 10 ccm n/20 HCl gebraucht. Die Reagenzgläser werden dann mit aqua dest. ad 23 aufgefüllt. Für jede Versuchsform werden je zwei gleiche Gläser (Parallele) vorbereitet. Für jedes Reagenzglas werden vier Bechergläser vorbereitet. In jedes Becherglas kommen 5 ccm Natronlauge von der Stärke, wie sie die Lösung im Reagenzglase entsprechend dem HCl-Zusatz ohne Rücksicht auf die Abstumpfung besitzen müßte. Sind beispielsweise zu der Caseinlösung 5 ccm n/10 HCl gegeben, so ist der Gehalt des Reagenzgläschens bei einem Endvolumen von 25 ccm n/50 HCl. Es werden daher in das Bechergläschen 5 ccm n/50 NaOH gegeben. Dieser Laugenzusatz dient dazu, den Säurezusatz zu neutralisieren, da die starke Säure den Puffer (s. oben) durchbrechen würde und die verschiedenen Trübungen verschiedene Aciditäten haben würden. Da die Neutralisation aber nie eine absolut genaue ist, kommen in jedes Bechergläschen noch 5 ccm Phosphatpuffer (s. oben). Die Bechergläser dienen zur Aufnahme der aus den Reagenzgläsern zu verschiedenen Zeiten entnommenen Substratfermentmischungen. Die 23 ccm der in den Reagenzgläsern befindlichen Lösung werden mittels Pipette sorgfältig durchmischt. 5 ccm werden entnommen und hiervon 4,5 ccm in je ein Bechergläschen fließen gelassen. 0,5 ccm werden verworfen. Zu den Bechergläschen werden 0,5 ccm H_2O gegeben. Daß nicht 5 ccm Lösung wie bei den weiteren Entnahmen, sondern nur 4,5 ccm bei der ersten Entnahme in die Bechergläser gegeben werden, findet seinen Grund darin, daß die in den Reagenzgläsern restierenden 18 ccm erst jetzt durch 2 ccm Fermentlösung verdünnt werden.

Als Fermentlösung dient die wässerige Lösung irgend eines guten käuflichen Pepsinpräparats. Die notwendige Fermentverdünnung, die geeignet ist, unter den gegebenen Bedingungen die Substratlösung zu etwa 50 Proz. zu spalten, muß jedesmal durch einen Vorversuch ermittelt werden. Für die geschilderten Bedingungen bei einer p_H von etwa 2 kamen bei Anwendung von Pepsin *Finzelberg* etwa Konzentrationen von 1 : 5000 bis 1 : 10000 in Frage. Da 2 ccm Fermentlösung in 20 ccm Volumen angewandt werden, ist die endgültige von uns angewandte Fermentkonzentration 1 : 50000 bis 1 : 100000 gewesen. Die Reagenzgläser sowie die Fermentlösungen werden getrennt in einen Thermostaten von 40° gebracht und etwa 15 Minuten zur Vorwärmung ruhig stehengelassen. Sodann wurde bei einer genau markierten Zeit in jedes Reagenzglas 2 ccm Fermentlösung getan und gut durchgemischt. Die Röhrchen blieben sodann im Thermostaten bei 40°. In genau abgemessenen Abständen von 10, 20 und 30 Minuten werden aus jedem Reagenzglas mittels Pipette 5 ccm Lösung entnommen und in je ein Becherglas zu den 5 ccm NaOH-Lösung fließen gelassen. Nach 30 Minuten wird der Versuch beendet. Die restierenden 5 ccm in den Reagenzgläsern dienten zur Bestimmung der p_H mittels der Gaskette.

Von jedem Versuchsröhrchen sind jetzt also Proben vor der Spaltung und nach 10, 20 und 30 Minuten langer Spaltung vorhanden. Die Eiweißmengen der in der Spaltung entnommenen Proben werden nun gegen die der vor der Spaltung entnommenen Probe, deren Eiweißgehalt zu 100 Proz. angenommen wird, bestimmt. Hierzu kommen in jedes Bechergläschen 5 ccm der gesättigten Chinidinlösung und aqua dest. (5 ccm ad 20). Nach 10 Minuten langem Stehen wird nephelometriert. Alle Messungen müssen mit größter Genauigkeit unter Anwendung von Stoppuhr und möglichst geeichten Pipetten, Büretten usw. erfolgen.

Tabelle XX gibt ein Beispiel einer derartig vorgenommenen Spaltung.

Abb. 1 gibt das graphische Bild der Spaltung. Es ist das gleiche Bild wie bei der Spaltung des Albumins, die Kurve verläuft anfangs geradlinig, um sich dann allmählich abzuflachen.

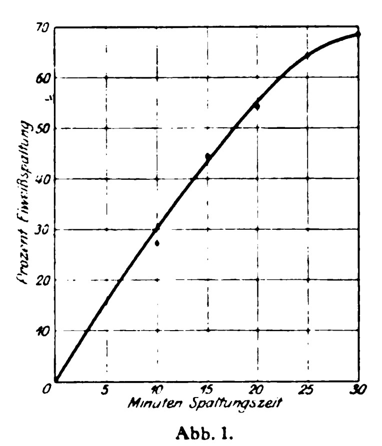


Abb. 1.

IV. Anwendung der Methode auf das Studium tryptischer Verdauung.

Die Untersuchung tryptischer Spaltung gestaltet sich ganz analog der der peptischen Spaltung. Nur wird an Stelle des Pepsins eine Verdünnung einer wässerigen Lösung von Trypsin angewandt und der Spaltungsvorgang auf der alkalischen Seite etwa bei p_H 8 vorgenommen.

Wie Tabelle XXI zeigt, sind die Spaltprodukte der tryptischen Verdauung bis zu einer Menge von 25 Proz. entsprechend dem Pepsinversuch ohne Einfluß auf die Caseintrübung. Dieser Nachweis gestaltete sich weit einfacher als beim Pepsin, da sich Casein tryptisch bis zum Verschwinden jeder Chinidinreaktion spalten ließ.

Tabelle XXII zeigt den Einfluß von Spaltprodukten entsprechend einer Spaltung von 50 bis 100 Proz. Der durch den Zusatz der Acetatmengen entstehende Salzfehler wird in Kontrollversuchen, die nur Salz aber keine Spaltprodukte enthalten, nachgeprüft. Es zeigt sich, daß die Abweichung, die 50 Proz. Spaltprodukte (III) veranlassen, genau der reinen Salzwirkung (V) entspricht. Die Kolumne II mit 100 Proz. Spaltprodukten weicht von der Kontrolle IV nur um 2,5 Proz. ab. Es sind also auch Spaltprodukte in einer Menge bis zu 100 Proz. ohne Einfluß auf die Trübung.

Eine Schwierigkeit schien sich nur daraus zu ergeben, daß sich die tryptische Spaltung nicht so gut unterbrechen zu lassen schien wie die peptische. Beim Pepsin wird ja die Spaltung bei Entnahme einer Probe dadurch augenblicklich unterbrochen, daß die Reaktion von sauer neutral wird.

Beim Trypsin wäre es wohl möglich, die Spaltung dadurch zu unterbrechen, daß die Reaktion nach der Entnahme sauer gemacht wird. Da aber zur Bestimmung wieder neutrale Reaktion hergestellt werden muß, könnte die Spaltung während der Bestimmung weiter gehen, und außerdem könnte leicht der Salzgehalt der Trübungen zu groß und die Bestimmungen dadurch fehlerhaft werden.

Es wurde daher untersucht, ob die mit Chinidin gefällten Caseinlösungen bei Zimmertemperatur weiterspalten.

Tabelle XXIII zeigt einen Versuch, in dem vier Trübungen mit gekochtem Ferment mit vier solchen, die wirksames Ferment in der Menge, wie es im Versuch vorhanden wäre, enthalten, verglichen werden.

Tabelle XX. (Figur 1).
Peptische Spaltung p_H 1,37.

Nr.	1			2			3			4			5			6			7		
Spaltungszeit in Minuten	0			5			10			15			20			25			30		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Nephelometrische Messung . . .		19,9	20,0	21,8	22,5	22,5	27,5	27,0	27,3	35,5	36,0	36,1	44,3	44,1	43,9	41,3	41,3	42,8		31,5	32,0
		20,4	20,0	21,8	22,7	22,5	27,3	27,5	27,6	35,3	35,8	36,1	43,9	44,0	44,5	41,5	41,6	42,5		32,0	31,5
		20,2	20,0	21,7	22,7	22,3	27,2	27,2	27,4	35,8	36,1	36,4	44,3	43,8	44,2	41,5	41,2	42,6		32,0	31,5
Durchschnitt	20,1			22,3			27,3			35,9			44,1			41,8			31,7		
Verglichen mit	1 = 20			20			20			20			20			15			10		
Eiweißspaltung in Proz. . .	0			10,3			26,7			44,3			54,6			64,1			68,4		

Tabelle XXI.
Einfluß der Spaltprodukte der tryptischen Verdauung auf die Trübung.

Nr.	1		2		3		4	
Spaltungsprodukt in ccm	0		1		4		6	
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	19,9	20,0	19,6	19,6	20,2	20,0
	20,0	20,0	19,8	20,0	20,2	19,6	20,0	20,0
	20,0	20,0	20,0	19,8	19,7	19,5	20,1	20,0
Durchschnitt	20,0		19,9		19,7		20,05	
Verglichen mit	1 = 20							
Abweichung in Proz.	0		0,5		1,5		0,25	

Tabelle XXII. Einfluß tryptischer Spaltprodukte in einer Menge entsprechend einer Spaltung bis zu 100 Proz.

Nr.	1		2		3		4		5	
Zusammensetzung der Lösung	5 ccm Casein 5 „ Puffer 5 „ dest. Wasser 5 „ Chinidinlösung		5 ccm Casein 5 „ Puffer 10 „ Spaltprodukte 5 „ Chinidin		5 ccm Casein 5 „ Puffer 5 „ Spaltprodukte 5 „ dest. Wasser 5 „ Chinidinlösung		5 ccm Casein 5 „ Puffer 10 „ Salzlösung 5 „ Chinidinlösung		5 ccm Casein 5 „ Puffer 5 „ Salzlösung 5 „ dest. Wasser 5 „ Chinidinlösung	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Nephelometrische Ablesung	20,0 20,0 20,0	19,9 19,5 19,9	23,5 23,4 23,5	24,0 24,2 24,0	21,6 21,4 21,5	21,6 21,4 21,5	24,4 24,5 24,4	23,9 24,0 24,1	21,6 21,5 21,5	21,6 21,6 21,3
Durchschnitt . .	19,8		23,7		21,5		24,2		21,5	
Verglichen mit . .					I a = 20					
Theoretischer Wert	20,0		20,0		20,0		20,0		20,0	
Abweich. in Proz.	1,0		18,5		7,5		21,0		7,5	

Tabelle XXIII. Versuch über Unterbrechung der Spaltung.

Kolben I a bis e mit aufgekochtem, unwirksamem, Kolben II a bis e mit wirksamem Ferment. p_H 7,8.

Nr.	I					II				
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
Nephelometrische Ablesung	20,0 20,0 20,0	20,3 20,6 20,5	19,8 19,8 19,8	19,9 19,9 19,9	20,2 20,2 20,2	20,0 19,8 19,9	19,5 19,7 19,7	20,3 19,9 20,0	18,9 19,0 19,5	20,5 20,6 20,4
Durchschnitt	20,1					19,8				
Verglichen mit . . .	I a = 20					I a = 20				
Theoretischer Wert . .	20					20				
Abweichung in Proz. .	0,5					1,0				

Wiederholung der Messungen nach 30 Minuten ergab dieselben Werte.

Die Versuche blieben $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur stehen und wurden dann gemessen. Es zeigt sich, daß bei den wirksames Ferment enthaltenden Lösungen keine Spaltung eingetreten war.

Bei der tryptischen Spaltung sollen daher in die Bechergläschen als Vorlage nicht nur Puffer, HCl entsprechend der zugesetzten Menge NaOH (wenn z. B. 2,5 ccm n/100 NaOH bei Gesamtvolumen 25 gegeben, werden 5 ccm n/1000 HCl vorgelegt), und Wasser, sondern auch schon Chinidin gegeben werden, so daß sofort bei der Entnahme die Trübung gebildet wird, während bei der Methode der peptischen Verdauung die Trübung erst nach Beendigung der gesamten Spaltung hergestellt wurde. Da aber die Trübung etwa $\frac{3}{4}$ Stunden hält, kann man die Messung gut noch nach $\frac{1}{2}$stündigem Stehen machen.

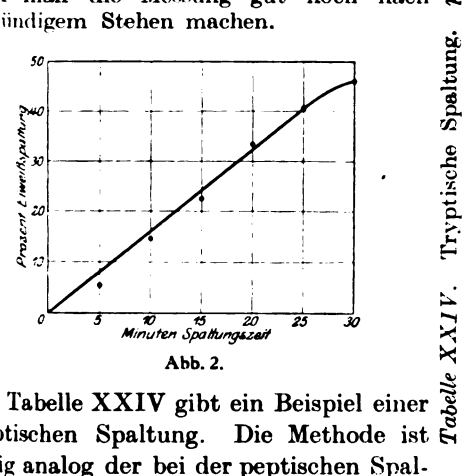


Abb. 2.

Tabelle XXIV gibt ein Beispiel einer tryptischen Spaltung. Die Methode ist völlig analog der bei der peptischen Spaltung geschilderten.

Nun wird an Stelle von HCl die Menge NaOH in die Reagenzgläser gegeben, die empirisch zur Erzielung der gewünschten p_H notwendig ist. Entsprechend wird dann, wie geschildert, HCl vorgelegt.

Wir verwendeten für den Versuch 2,5 ccm n/100 NaOH und spalteten bei einer p_H von 7,8 $\frac{1}{2}$ Stunde.

Als Trypsin verwendeten wir eine Lösung von Pankreatin Rhenania, die wir durch Digerieren von 0,1 g Pankreatin in 100 ccm Wasser und Verdünnung desselben etwa 1 : 5 herstellten. Die endgültige Ver-

Tabelle XXIV. Tryptische Spaltung. p_H 7,8.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Spaltungszeit in Minuten	0	5	10	15	20	25	30
Nephelometrische Ablesung	20,0 20,1 20,0	21,0 21,0 20,8	23,7 23,5 23,0	25,9 25,9 25,7	30,1 29,9 29,7	33,7 33,6 33,6	37,0 36,2 37,0
	20,0 20,1 20,0	21,0 21,0 20,5	23,7 23,5 23,0	25,9 26,0 25,5	30,0 30,0 29,7	33,7 33,4 33,5	37,2 36,4 37,0
	20,0 20,0 20,0	20,9 20,6 20,6	23,7 23,4 23,0	25,9 26,0 25,7	30,0 30,0 29,6	33,5 33,7 33,4	37,2 36,4 37,0
Durchschnitt	20,1	21,3	23,4	25,8	29,9	33,6	36,9
Verglichen mit	1 = 20						
Eiweißspaltung in Proz.	0	6,1	14,5	22,5	33,1	40,5	45,8

dünnung war also 1 : 5000. Die Fermentverdünnung im Versuch betrug dann 1 : 50000.

Abb. 2 gibt die graphische Darstellung der tryptischen Verdauung. Sie gleicht völlig den bekannten Bildern, indem sie analog der Pepsinkurve zuerst geradlinig verläuft, um dann sich allmählich abzuflachen.

Zusammenfassung.

Eine Methode zur schnellen Bestimmung von Caseinlösungen wird beschrieben.

Die Methode beruht auf der Erzeugung von Trübungen in Caseinlösungen mittels Chinidinum hydrochloricum und nephelometrischem Vergleich von Lösungen bekannten und unbekannten Gehaltes.

Als Nephelometer dient das Nephelometer von *Schmidt* und *Haensch*.

Die Methode verfolgt den Zweck, weitere Substrate der nephelometrischen Untersuchung fermentativer Eiweißspaltung zugänglich zu machen.

Als Caseinlösung wird eine Caseinstammlösung verwandt, die einen Gehalt von 0,25 Proz. Casein und n/40 Natriumacetat — zur Lösung des Caseins — hat. Gut meßbare Trübungen können mit 5 ccm einer Verdünnung dieser Lösung 1 : 5 erhalten werden. Die Größenordnung gut bestimmbarer Caseinmengen liegt etwa zwischen 1 bis 5 mg Casein in 20 ccm Volumen. Untere Grenze der Methode bei Anwendung der Mikrogefäße etwa 0,1 mg. Als Reagens dient heiß gesättigte Lösung von Chinidinum hydrochloricum. Die Reaktionen sollen bei annähernd neutraler Reaktion stets bei gleicher p_H vorgenommen werden. Hierzu dient ein Zusatz von Phosphatpuffer (5 ccm einer Mischung von 9 Volumenteilen m/15 sekundären Natriumphosphats und 1 Volumenteil m/15 primären Kaliumphosphats) bei einem Endvolumen von 20 ccm. Die notwendige Reagenzmenge für die angegebene Caseinmenge beträgt 5 ccm. Zu 5 ccm der klaren Caseinlösung werden 5 ccm Puffer gegeben. Dann werden 5 ccm Reagens hinzugefügt. Die Lösung wird mit aqua dest. auf 20 gebracht und nephelometriert.

Die Trübungen bleiben bis zur Messung etwa 10 Minuten stehen. Sie sind dann etwa ³/₄ Stunden unverändert haltbar. Das Volumen der Lösung beim Reagenzzusatz spielt keine Rolle. Die Trübungen vertragen ohne Änderung einen Salzgehalt bis zu etwa n/40 bis n/30. Höher darf der Salzgehalt ohne Beeinflussung der Trübung nicht werden. Calciumsalze dürfen nicht zugegen sein. Die Trübungen sind beliebig oft gut reproduzierbar. Einzelne Ausfälle mit Abweichung von einigen Prozenten kommen gelegentlich vor. Die Messungen sollen daher stets im Parallelversuch angestellt werden. Es besteht innerhalb der angegebenen Grenzen genaue Proportionalität zwischen Trübungs-

stärke und Konzentration. Dieses allgemeine nephelometrische Gesetz wird auch bei der Chinidintrübung des Caseins wieder bestätigt. Der Fehler der Methode beträgt etwa 1 bis 2 Proz.

Die Methode wird zum Studium der peptischen Verdauung des Caseins verwandt. Die Spaltprodukte beeinflussen die Trübung nicht. Eine genaue Vorschrift zur Verfolgung der peptischen Verdauung wird gegeben.

In gleicher Weise wird die Methode zur Untersuchung von tryptischer Verdauung des Caseins verwandt.

Auch hier sind die Spaltprodukte ohne Einfluß. Die Methode ermöglicht sowohl für die peptische wie auch für die tryptische Verdauung die genaue und schnelle Darstellung des Spaltungsvorganges.

(Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft ausgeführt.)

Literatur.

1) *P. Rona* und *H. Kleinmann*, diese Zeitschr. **140**, 461, 478, 1923. — 2) *Dieselben*, ebendaselbst **150**, H. 5/6, S. 444. — 3) *P. Rona* und *van Eweyk*, ebendaselbst **140**, 175, 1924. — 4) *H. Kleinmann*, ebendaselbst **99**, 115, 1919; **137**, 144, 1923. — 5) *Derselbe*, Kolloid-Zeitschr. **27**, H. 5, 1920.

Beiträge zur Kenntnis einiger bisher wenig studierter Inhaltsstoffe der Milch (Kuhmilch). II.

Von

B. Bleyer und **O. Kallmann.**

[Aus dem chemischen Institut der landwirtschaftlichen Hochschule Weihenstephan und aus dem chemischen Laboratorium der wissenschaftlichen Zweigstelle München der chemischen Fabriken Merck, Boehringer, Knoll (Lactanawerke).]

(Eingegangen am 5. Dezember 1924.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Der wasserlösliche gelbgrüne Farbstoff der Milch (Kuhmilch).

Zur Einführung schicken wir die Worte anerkannter Autoren auf dem Gebiete der tierischen Pigmente und Farbstoffe voraus.

Fr. Samuely und *E. Strauß* leiten ihre Monographie über die genannten Stoffe in *E. Abderhalden*, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abt. I., Teil 8) mit folgenden Worten ein: „Das Kapitel der ‚tierischen Farbstoffe' ist ein Kapitel der Entsagung chemischer Analyse und biochemischer Forschung."

Es liegt zwar zum Teil ein umfangreiches Material über tierische Farbstoffe, über ihre Verbreitung und ihre physiologischen Beziehungen vor, aber gegenüber dieser Fülle an Einzelbeobachtungen ist unser positives Wissen über die chemische Natur der meisten Farbstoffe und Pigmente ein bedauerlich geringes. Die Hauptschwierigkeit liegt darin, ausreichendes und reines Untersuchungsmaterial zu gewinnen. Entweder handelt es sich nur um jeweils kleine Mengen Farbbestandteile oder diese sind sehr labil und vergänglich bzw. gerade umgekehrt auch wieder sehr widerstandsfähig gegen chemische Agenzien, so daß sie sich auf die eine oder andere Weise der Bearbeitung entziehen.

Wenn wir uns trotz dieser grundsätzlichen Schwierigkeiten entschlossen haben, an die Frage nach der chemischen Natur des wasserlöslichen, gelbgrünen Farbstoffs der Milch heranzugehen, so veranlaßte uns dazu vor allem die Aussicht, mit großen Mengen von Ausgangsmaterial arbeiten zu können, eine Möglichkeit, die sonst nicht so leicht zu Gebote steht. Man sah immer den Farbstoff vor sich, denn in einer

Käserei sind alle Geräte, die bei der Käsebereitung benutzt werden (Käsetücher, Rührscheite usw.) auffallend grüngelb gefärbt, und es ist deshalb schon auch aus diesem Grunde eigentümlich, daß man sich bisher wenig um diesen Farbstoff bemüht hat. Im Laboratorium freilich, wo man meist mit nur geringen Milchmengen arbeiten kann, entzieht sich der Farbstoff der allgemeinen Beachtung.

Nach praktischer Erfahrung hat man es in der Milch mit zwei Farbstoffen zu tun, mit einem lipoidlöslichen und mit einem wasserlöslichen Farbstoff. Der lipoidlösliche Farbstoff ist im Milchfett gelöst und erscheint vor allem in der Butter. Die Mengenverhältnisse hängen ganz von den Fütterungsverhältnissen und von anderen äußeren Verhältnissen ab, unter denen die milchliefernde Kuh steht. Bekanntlich nimmt mit Beginn der Grünfütterung der Gehalt der Milch und damit der Butter an lipoidlöslichen Farbstoffen schnell und erheblich zu, die Anreicherung hält sich während des Weideganges und während der Möglichkeit weiterer Grünfütterung und nimmt schnell wieder mit der Trockenfütterung ab. Der hier in Frage stehende Farbstoff ist schon öfter studiert worden, allerdings noch nicht mit abschließendem Urteil, aber es läßt sich wohl mit Recht sagen, daß der Farbstoff zu der Klasse der gelbroten Carotine gehört, also ein Kohlenwasserstoff ist, der in unmittelbarer Beziehung zur Art und Verfassung der dem milchliefernden Tiere zur Verfügung stehenden vegetabilischen Nahrung steht.

Dieser lipoidlösliche Carotinfarbstoff geht mit dem Milchfett in den Rahm und gegebenfalls übrigbleibende kleine Reste fallen bei der Gerinnung mit dem Casein aus. Die Molke aber, das nach der Entfernung des Milchfettes und des Caseins bzw. des Käsestoffes übrigbleibende Milchserum, zeigt während des ganzen Jahres eine fast immer gleichbleibende, schwach grüngelbe Farbe. Der diese Farbe bedingende Körper zieht, wie schon kurz erwähnt, sehr leicht in dem schwach milchsauren Bade, das die Molke vom färbereitechnischen Standpunkt aus darstellt, auf Baumwolle, Leinenfaser und Holz, nicht auf Wolle. Er ist aller Erfahrung nach gegen Belichtung, vielleicht auch gegen Lufteinwirkung ziemlich empfindlich, denn Gegenstände, die durch ihn gefärbt sind, werden im praktischen Betriebe in die Sonne gestellt, wobei bald ein Ausbleichen stattfindet. Ferner ist bei der Beobachtung eine sehr deutliche Fluoreszenz im auffallenden Lichte ohne roten Einschlag, vielmehr rein nach der grünen Seite hin, auffallend und, wie schon erwähnt, ist diese Fluoreszenz während des ganzen Jahres vorhanden, ohne daß im Sommer während der Grünfütterung eine Anreicherung festzustellen wäre. Wir haben gerade auch diesem letzten Punkte durch eingehende Beobachtung und Messung mit einem *Stammer*schen Koloriskop Aufmerksamkeit ge-

schenkt. Man hat es also wohl mit einem konstanten Inhaltsstoff der genuinen Milch zu tun, mit einem grüngelben, wasserlöslichen Farbstoff.

Ein geschichtlicher Rückblick zeigt, daß die erste Arbeit, die sich mit einem Farbstoff der Kuhmilch beschäftigt, von *A. W. Blyth*[1]) im Jahre 1879 veröffentlicht wurde. In dieser Abhandlung, die unter der Überschrift „Lactochrom" erschien, wurde das Vorhandensein zweier neuer alkaloidartiger Körper als normaler Bestandteile der Kuhmilch mitgeteilt. Den einen dieser Körper, eine weiße, amorphe Substanz, bezeichnete *A. W. Blyth* als „Galaktin", den anderen aber, eine glänzende harzähnliche rotorange Masse, hielt er für den Farbstoff der Milch und nannte ihn deshalb „Lactachrom". Er gelangte zu diesen Stoffen, indem er die Milch durch Essigsäurefällung vom Eiweiß befreite und dann Fällungen mit Phosphorwolframsäure (*Scheiblers* Reagens), Phosphormolybdänsäure (*Sonnenscheins* Reagens) und Quecksilbernitrat vornahm.

Zur Darstellung wurde von ihm jedoch nur das Quecksilbernitrat als Fällungsmittel benutzt, da bei Anwendung der beiden anderen Reagenzien durch Ausziehen des Niederschlages mit heißem Barytwasser große unvermeidliche Verluste eintraten.

Er entfernte aus 1 Liter Milch das Eiweiß durch Essigsäurezusatz unter Verdünnen auf das doppelte Volumen und fällte die klare Molke mit Quecksilbernitrat. Das Filtrat vom erhaltenen Niederschlag, der nach seiner Ansicht ein Gemisch von Galaktin, Lactochrom, geringen Mengen von Albumin und Harnstoff, an Quecksilber gebunden, darstellte, zersetzte er mit Schwefelwasserstoff, um das überschüssige Quecksilber zu entfernen, und nahm eine neue Fällung mit Bleiacetat vor. Aus dem entstehenden, leicht gefärbten Niederschlag gewann er durch Reinigung den ersten alkaloidartigen Körper, das Galaktin, als eine reine, weiße Substanz. Das Filtrat vom Bleiacetatniederschlag befreite er durch Zersetzen mit Schwefelwasserstoff vom überschüssigen Blei und erhielt dann durch Zugabe von Quecksilbernitrat als Abscheidung den zweiten alkaloidartigen, gefärbten Stoff, der nach seiner Ansicht die Quecksilberverbindung des Milchfarbstoffs, des Lactochroms, darstellte. Er nahm für ihn als wahrscheinlich einfachste Formel an:

$$HgOC_6H_{18}NO_4.$$

Zusammensetzung:

HgO . .	gefundener Wert	51,97,	berechneter Wert	51,92
C . . .	„ „	17,42,	„ „	17,06
H . . .	„ „	4,32,	„ „	4,32
N . . .	„ „	4,00.	„ „	3,46
O . . .	„ „	—	„ „	23,34

Reines Lactochrom wurde von ihm durch sorgfältige Zersetzung des Quecksilbersalzgemisches erhalten. Beim Verdampfen der Lösung des Lactochroms in Wasser oder Alkohol hinterblieb eine glänzende harzähnliche rotorange Masse, die bei 100° erweichte, leicht löslich in Wasser war, aus ihrer Lösung in heißem Alkohol sich aber beim Erkalten wieder ausschied.

Konzentrierte Lösungen gaben ein einfaches Spektrum, das die roten und gelben Strahlen durchließ, indem keine Streifen verdeckt waren.

[1]) *A. W. Blyth*, Journ. chem. Soc. 1879, S. 530.

Gehaltsbestimmungen der Milch ergaben für Galaktin 0,15 bis 0,20 Proz. für Lactochrom jedoch Werte, die zwischen 0,1 und 0,001 Proz. schwankten. Dieses unbefriedigende Ergebnis führte *A. W. Blyth* auf die leichte Zersetzbarkeit und schwierige Reinigung des Lactochroms zurück.

Eine weitere Bearbeitung erfuhr der Farbstoff durch *Desmoulière* und *Gautrelet*[1]) im Jahre 1903. Die Autoren gelangten zu ihrem Farbstoff durch Hitzekoagulation der Milch bei Gegenwart von Essigsäure, Ansäuerung der entstandenen Molke und Aussalzen mit Ammonsulfat im Überschuß. Der Niederschlag wurde nach mehrstündigem Stehenlassen filtriert (Filtrat farblos); er wurde mit gesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen und dann mit 98proz. Alkohol ausgezogen. Die alkoholische

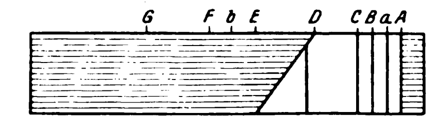


Abb. 1. Lactochromspektrum nach *A. W. Blyth.*

Lösung wurde bei niedriger Temperatur eingedampft und der Rückstand mit Ammoniak aufgenommen. Nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure wurde wiederum mit Ammonsulfat ausgesalzen, worauf sich der Farbstoff in Form von rötlichen Flocken ausschied, die sich in reinem Wasser wenig, bei Gegenwart von etwas Alkali aber leicht lösten.

Der isolierte Farbstoff gab mit Schwefelsäure keine Blaufärbung (Carotin) und mit salpetrigsäurehaltiger Essigsäure keine Grünfärbung, weshalb die Autoren schlossen, daß es sich nicht um ein Lipochrom bzw. um einen Gallenfarbstoff handeln könne.

Die alkoholische Lösung, die deutlich gelbgrünstichig mit leichter Fluoreszenz war, gab nach der Ansäuerung bei der spektrographischen Untersuchung das Urobilinband; die Fluoreszenz verschwand bei Zugabe von mehr Säure, kehrte zurück bei Zugabe von Ammoniak und wurde weiter verstärkt durch ammoniakalische Zinkchloridlösung; die zinkchloridhaltige Lösung zeigte das Urobilinband wiederum deutlich.

Diese Anzeichen ließen die Autoren zu der Anschauung kommen, daß dieser aus der Milch isolierte Farbstoff im wesentlichen mit Urobilin identisch ist. Das Vorhandensein von Urobilin in der Milch schien auch deshalb diskutierbar, weil es sich im Blute und in verschiedenen Sekreten und Exkreten des Organismus vorfindet.

Eine weitere Arbeit wurde im Jahre 1914 von *S. Palmer*, dem bekannten Carotinforscher, und *H. Cooledge*[2]) veröffentlicht. Diese gibt schon in der Überschrift: „Lactochrom — das gelbe Pigment des Milchmolkens — ist wahrscheinlich identisch mit Urochrom, dem spezifisch gelben Farbstoff des normalen Harns“, den Inhalt des näheren an.

S. Palmer und *H. Cooledge* führen darin aus, daß die natürliche gelbe Farbe der Kuhmilch durch zwei ganz verschieden geartete Farbstoffe hervorgerufen wird und daß sich der wichtigere von diesen im Milchfett befindet. Dieser besteht aus einer Mischung von Carotin und Xanthophyll, hauptsächlich Carotin, die in das Milchfett durch das von der Kuh aufgenommene Grünfutter gelangen.

---

[1]) *Desmoulière* und *Gautrelet*, C. r. 55, 632, 1903.

[2]) *S. Palmer* und *H. Cooledge*, Journ. of biol. Chem. 17, 251, 1914.

Die Anwesenheit des zweiten, weniger gelben Farbstoffes in der Milch, der noch nicht identifiziert worden ist, wird durch die weiße Farbe des Caseins verdeckt und nur in den Molken beobachtet, die nach der Gerinnung des Caseins zurückbleiben. Alsdann verleiht dieser Farbstoff den Molken die gewöhnliche grüngelbe Farbe; dies ist eine jedem Käser bekannte Erscheinung.

Die Autoren suchten nun, Beziehungen zwischen dem Molkenfarbstoff und bekannten tierischen Farbstoffen ähnlichen Charakters festzustellen und seine Wichtigkeit bei der Farbstoffbildung der Milch zu ergründen.

Sie stellten zunächst das von *A. W. Blyth* beschriebene Lactochrom her und fanden, daß der erhaltene Farbstoff ganz dessen Angaben entsprach. Alsdann prüften sie die Arbeit von *Desmoulière* und *Gautrelet* nach und stellten fest, daß der von diesen durch Sättigung der Molken mit Ammoniumsulfat gewonnene Farbstoff nicht, wie angegeben, mit Urobilin identisch war, sondern wahrscheinlich derselbe, wie der von *A. W. Blyth* hergestellte.

Dagegen fanden sie eine Ähnlichkeit zwischen ihrem Lactochrom, das sie für den Träger der Molkenfarbe hielten, und dem Urochrom, dem spezifisch gelben Farbstoff des Harns auf Grund der folgenden Eigenschaften:

Beide Farbstoffe sind löslich in Wasser und gewöhnlichem Alkohol, schwer löslich in absolutem Alkohol. Sie sind beide spektroskopisch träge und bilden Metallverbindungen mit Silber, Quecksilber und Kupfer. Sie lassen sich aus ihren Stammlösungen auf gleiche Weise isolieren, wobei die erhaltenen Auszüge identisch sind.

Auf einen Vergleich der elementaren Zusammensetzung beider Stoffe verzichteten *S. Palmer* und *Cooledge*, weil beide Stoffe schwer rein darzustellen sind und weil über Urochrom keine übereinstimmenden Resultate vorliegen. Sie zogen aber charakteristische Additionserscheinungen zur weiteren Identifizierung heran und stellten fest, daß sowohl reine wie auch rohe alkoholische Lösungen beider Farbstoffe mit aktivem Acetaldehyd reagierten.

Setzten sie zu den Farbstofflösungen 10 Proz. Acetaldehyd zu, so vertiefte sich der gelbe Farbton beim Erwärmen oder Stehenlassen im Sonnenlicht zu Orange, und es zeigte sich das Absorptionsband des neutralen oder sauren Urobilins. Ammoniak führte die Farbe in lichtes Gelb über und brachte das Absorptionsband zum Verschwinden. Einige Tropfen Zinkchlorid gaben das breite Band des Urobilinzinks bei gleichzeitiger Fluoreszenz. Bei längerer Einwirkung des Acetaldehyds auf die Farbstofflösungen vertiefte sich deren Farbton zu Rotbraun, und es erschien ein zweites Band im Blau, etwa 200 Wellenlängen vom ersten entfernt.

Weiter fanden sie, daß eine von ihnen dargestellte Bromverbindung in fast jeder Hinsicht mit der nach dem Verfahren von *K. E. Salomonson* und *St. Mancini*[1]) gewonnenen Bromverbindung des Urochroms identisch war.

Alkoholische Lösungen dieser Bromverbindungen, die sie durch Zugabe von etwas Alkali erhielten, reagierten nach der Neutralisation durch Salzsäure mit aktivem Acetaldehyd wie freies Lactochrom und Urochrom.

Auf Grund der Feststellungen ihrer Arbeit kommen *S. Palmer* und *H. Cooledge* dann zu dem Schluß, daß eine sehr nahe Verwandtschaft

[1]) *K. E. Salomonson* und *St. Mancini*, diese Zeitschr. **13**, 205, 208, 1908.

zwischen Lactochrom und Urochrom besteht, da die hauptsächlichsten Charakteristika identisch sind. Die Reaktion mit Acetaldehyd folgt überall der Isolierung der Farbstoffe, die nach der Behandlung mit Acetaldehyd ihre charakteristischen Eigenschaften verlieren. Die Reaktion der Bromverbindung ist möglicherweise auf eine Verunreinigung mit freiem Lactochrom zurückzuführen, das der Bromierung entschlüpft ist. Ferner ist denkbar, daß die Aldehydreaktion einer oder mehrerer Gruppen des Lactochrom- und Urochrommoleküls zugehörig ist, wodurch die Reaktion der Bromverbindung sofort erklärbar wird.

Interessante Feststellungen über Lactochrom finden sich weiter noch in einer im Jahre 1920 erschienenen Abhandlung von *K. T. Pelkan*[1]), die sich mit den Beziehungen des Urochroms zum Protein der Nahrung beschäftigt. *Pelkan* stellte fest, daß eine wenig proteinhaltige Nahrung die Urochromausscheidung beträchtlich vermindert und eine hochproteinhaltige die Ausscheidung merklich vermehrt. Er berichtete ferner von einem neuen Körper, den er aus einigen Proteinen nach einem dem Gewinnungsprozeß von Lactochrom und Urochrom analogen Verfahren darstellte.

Als Ausgangsmaterialien zur Gewinnung dieses Körpers benutzte er Pepton und Casein, das er zuvor einem Verdauungsprozeß mit Salzsäure unterwarf. Den erhaltenen Stoff bezeichnete er als „Protochrom". Er fand, daß dieser alle Reaktionen des Urochroms gab, das von *S. Palmer* und *H. Cooledge* zur Identifizierung von Urochrom und Lactochrom gebraucht wurde.

Auf Grund dieser Tatsache und derjenigen, daß eine weniger Protein, also auch weniger Protochrom enthaltende Nahrung die Urochromausscheidung um mehr als 50 Proz. verminderte, hielt sich *K. T. Pelkan* zu der Folgerung berechtigt, daß beide Körper identisch sind. Somit besteht nach seiner Ansicht eine Identität zwischen Lactochrom, Urochrom und Protochrom. Er glaubt, daß diese Körper zum mindesten in hohem Maße von den Proteinen der Nahrung abstammen.

Dieser geschichtliche Überblick zeigt zwar allerlei interessante Kombinationen, gibt aber keinen Aufschluß über die wirklichen Eigenschaften des reinen Molkenfarbstoffs, ohne deren Kenntnis es doch nicht möglich ist, auf die Identität dieses Farbstoffs mit irgend einem anderen zu schließen. Deshalb mußte es Aufgabe dieser Arbeit sein, zunächst einmal den Farbstoff rein darzustellen, falls dies mit den zu Gebote stehenden Mitteln durchführbar war.

Zur Nachprüfung der in den erwähnten Arbeiten gemachten Angaben wurde zunächst versucht, den Farbstoff analog dem von *Desmoulière* und *Gautrelet* angewendeten Verfahren zu gewinnen.

Als Ausgangsmaterial für die Darstellung wurde Käsereimolke, und zwar süße Labmolke benutzt. Diese wurde durch Aufkochen möglichst vom Albumin befreit und im Vakuum bis zur beginnenden Milchzuckerkristallisation eingedampft. Dies entspricht einer Ein-

[1]) *K. T. Pelkan*, Journ. of biol. Chem. **43**, 237, 1920.

engung auf ungefähr ein Zehntel des ursprünglichen Volumens. Die Hauptmenge des ausgeschiedenen Milchzuckers wurde abzentrifugiert, die gelbe Flüssigkeit mit Ammoniumsulfat gesättigt und nochmals im Vakuum auf die Hälfte des Volumens eingedickt. Von dem so erhaltenen Brei wurden je 300 g mit 300 ccm 96proz. Alkohol ausgeschüttelt. Der Farbstoff ging in Lösung und der gelbe Auszug wurde nach dem Absitzenlassen vom Rückstand abfiltriert. Bei einem nochmaligen Ausschütteln des hellgrau gefärbten, aus Ammoniumsulfat, Milchzucker, Milchsalzen und Eiweißstoffen bestehenden Rückstandes mit Alkohol blieb dieser farblos. Aus der gelben Farbstofflösung wurde der Alkohol abdestilliert und der gelbbraune Rückstand auf dem Wasserbade vorsichtig eingedampft. Es hinterblieben 30 g einer glänzenden, rotbraunen harzigen Masse, deren Konsistenz sich auch nach mehrtägigem Trocknen bei 40° nicht wesentlich änderte.

Diese Masse, die in den vorher erwähnten Arbeiten als „Lactochrom“ bezeichnet worden war, hatte folgende Löslichkeitsverhältnisse:

1. in Wasser leicht aber trübe löslich;
2. in 50proz. Alkohol klar löslich;
3. in 70- und 80proz. Alkohol kalt nur zum Teil löslich, völlig beim Erwärmen;
4. in 96proz. Alkohol kalt unlöslich, beim Erwärmen teilweise löslich unter Wiederausscheidung beim Erkalten;
5. in Eisessig kalt zum Teil löslich, völlig löslich beim Erwärmen;
6. in Aceton, Äther, Petroläther, Amylalkohol, Benzol, Chloroform, Schwefelkohlenstoff und Essigester unlöslich.

Die Lösungen in Wasser, Alkohol und Eisessig waren gelb gefärbt, bei stärkerer Konzentration gelbbraun. Die Reaktion der wässerigen Lösung war sauer.

Der so isolierte Farbstoff, den *A. W. Blyth* als Reinprodukt betrachtet, mußte noch von großen Mengen fremder Stoffe begleitet sein, die mit in alkoholische Lösung übergegangen waren. Es wurde versucht, den Farbstoff aus diesem Rohprodukt zur Kristallisation zu bringen; dies gelang aber nicht. Deshalb wurde ein Reinigungsprozeß vorgenommen.

Ein Teil der Substanz wurde in 5 Teilen 87proz. Alkohols in der Wärme gelöst und mit 10 Teilen Aceton unter Eiskühlung versetzt. Es entstand ein rotbrauner, zähflüssiger Niederschlag. Die überstehende Flüssigkeit wurde vorsichtig abgegossen und dann der Niederschlag durch mehrmaliges Auswaschen mit Äther von den Resten der anhaftenden Flüssigkeit befreit. Nach dem bei einer Temperatur von 70° erfolgten Trocknen stellte der Niederschlag ein rotbraunes hygroskopisches Pulver dar. Dies wurde noch ein zweites und drittes Mal nach dem gleichen Verfahren behandelt und so der gereinigte Farbstoff in fast trockenem Zustande erhalten. Er sei als Farbstoff I bezeichnet.

Es bestand die Möglichkeit, daß die zur Trocknung angewendete Temperatur zu hoch war. Deshalb wurde ein zweiter und dritter Teil des Rohproduktes in gleicher Weise gereinigt, aber im Vakuumtrockenschranke bei einer Temperatur von 50⁰ getrocknet. Die so erhaltenen Farbstoffe II und III waren heller gefärbt als Farbstoff I.

Alle drei Farbstoffe reagierten neutral, ihre wässerige Lösung war klar gelb. Die Löslichkeitsverhältnisse waren von denen des Rohproduktes nicht wesentlich verschieden.

Es wurden mit ihnen qualitative Elementaranalysen ausgeführt, die einander analog verliefen und die Anwesenheit von Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Chlor ergaben, sowie die Abwesenheit von Schwefel, Phosphor und Arsen.

Auf Grund dieser Analysen bestanden die Farbstoffe aus C, H, N, O und enthielten ionogen gebundenes Chlor. Sie besaßen kein Reduktionsvermögen und waren nicht mehr optisch aktiv.

Schmelzpunktsbestimmungen im zugeschmolzenen Glasröhrchen ergaben für Farbstoff I keinen einwandfreien Schmelzpunkt, für Farbstoff II und III lag er bei 90⁰.

Verbrennungen der Farbstoffe zeigten folgende prozentuale Zusammensetzung:

	Farbstoff I Proz.	Farbstoff II Proz.	Farbstoff III Proz.
C	34,00	38,45	39,90
H	6,87	7,54	7,71
N	12,72	10,78	10,60
O	46,41	43,23	41,79

Aus diesen Werten war ersichtlich, daß die isolierten Farbstoffe nicht einheitlicher Natur waren. Ihre Zusammensetzung legte die Vermutung nahe, daß die Körper den Eiweißstoffen nahestanden. Deshalb wurde die weitere Untersuchung unter diesem Gesichtspunkte vorgenommen.

Die *Heller*sche Ringprobe gab beim Überschichten von konzentrierter Salpetersäure mit den Farbstofflösungen an der Berührungsstelle einen rotbraunen Ring. Ferrocyankali gab mit den Lösungen bei Zusatz von Essigsäure keinen Niederschlag. Mit den Alkaloidreagenzien Gerbsäure, Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure, sowie mit *Millons* Reagens traten Fällungen ein. Die Biuretreaktion war schwach positiv.

Nach den Ergebnissen dieser Reaktionen war eine nahe Verwandtschaft der Farbstoffe zu Proteinen sehr wahrscheinlich geworden. Einwandfrei zeigte sich die Eiweißnatur durch ihre Fällbarkeit mit Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat, Zinksulfat, Calciumchlorid usw.

Zur näheren Identifizierung wurden die Fällungsgrenzen der Farbstoffe mit Ammoniumsulfat und Magnesiumsulfat bestimmt.

2 ccm der Farbstofflösungen 0,1 : 40 wurden mit abgestuften Mengen gesättigter Ammoniumsulfat- und Magnesiumsulfatlösung versetzt und mit destilliertem Wasser auf 10 ccm aufgefüllt.

Die untere Fällungsgrenze für Ammoniumsulfat wurde so auf 30 Proz. und die für Magnesiumsulfat auf 50 Proz. ermittelt. Die obere Fällungsgrenze für Ammoniumsulfat war 80 Proz., die für Magnesium 100 Proz.

Nach dem Ergebnis folgender Reaktionen könnte man schließen, daß die Farbstoffe Albumosencharakter besaßen:

1. durch Hitze nicht koagulierbar, wohl aber durch Ammoniumsulfat und Zinksulfat aussalzbar;
2. durch hochprozentigen Alkohol fällbar, in verdünntem Alkohol löslich;
3. Biuretreaktion schwach, aber mit roter, ins Violette spielender Farbe;
4. mit Jodquecksilber-Jodkali dicker roter Niederschlag;
5. Diffusion durch Pergament;
6. beim Aussalzen Ausscheidung eines zähen, klebrigen Niederschlages.

Peptoneigenschaften waren dagegen die nachstehenden:

1. sehr leichte Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in Eisessig, teilweise Löslichkeit in Alkohol, Unlöslichkeit in allen anderen gebräuchlichen Lösungsmitteln;
2. keine Fällung durch Ferrocyankali und Essigsäure, wie durch Metaphosphorsäure;
3. Fällung durch Gerbsäure und Phosphorwolframsäure.

Durch diese Untersuchungen stand zunächst fest, daß die dargestellten Farbstoffe aus Eiweißabbauprodukten bestanden, vielleicht in Verbindung mit dem eigentlichen Molkenfarbstoff. Doch konnten sie auf keinen Fall als „Molkenfarbstoffe" bezeichnet werden. Wären sie wirklich die Träger der Molkenfarbe gewesen, dann hätten sie, genügend verdünnt, auch einen der Molkenfarbe entsprechenden Farbton in ihrer Lösung zeigen müssen. Während die Molken eine grüngelbe Farbe besitzen, waren die Lösungen der isolierten Farbstoffe jedoch goldgelb gefärbt. Ebenso fehlte die in alkoholischer Lösung auftretende Fluoreszenz des Molkenfarbstoffs, die als ein Charakteristikum anzusehen ist, vollständig in den Lösungen dieser Farbstoffe.

Der von den schon erwähnten Forschern isolierte und von ihnen als Lactochrom bezeichnete Farbstoff dürfte analog den oben beschriebenen Stoffen zusammengesetzt gewesen sein. *A. W. Blyth* erhielt seinen Farbstoff nach Zersetzung des Quecksilbersalzgemisches und Eindampfen der wässerigen oder alkoholischen Lösung als eine glänzende, harzähnliche, rotorange Masse, die bei 100° erweichte. Diese war in

Wasser sehr leicht löslich, löste sich auch in heißem Alkohol, schied sich aber aus diesem beim Erkalten wieder ab. Konzentrierte Lösungen seines Farbstoffs gaben ein einfaches Spektrum, das die roten und gelben Strahlen durchließ; es waren keine Streifen vorhanden. Diese von *A. W. Blyth* angegebenen Charakteristika seines Farbstoffs stimmen gut mit den Eigenschaften des Rohproduktes überein, aus dem später die gereinigten Farbstoffe gewonnen wurden.

Die Arbeit von *S. Palmer* und *H. Cooledge* baut sich auf dem von *A. W. Blyth* angewendeten Verfahren zur Gewinnung des Farbstoffs auf. Die Reaktion des von ihnen isolierten Farbstoffs mit Acetaldehyd dürfte im wesentlichen auf Reststickstoffbestandteile der Milch zurückzuführen sein.

Die Bildung des bisher als Molkenfarbstoff angesehenen Farbstoffs ist sicherlich sekundär aus Eiweißstoffen erfolgt, die sich noch in der Lösung befanden, aus welcher der Farbstoff durch Eindampfen gewonnen wurde. Darauf weist auch die Darstellung des „Protochroms" von *K. T. Pelkan* hin, das dieser für identisch mit „Lactochrom" und Urochrom hielt.

Wir suchen also die Erklärung für die Bildung der gefärbten Eiweißabbauprodukte in der bei allen Gewinnungsprozessen ungenügend vorgenommenen Enteiweißung. Wie im Abschnitt über den Reststickstoff gezeigt wurde, enthält Molke (Milchserum) stets große Anteile an Eiweißabkömmlingen, die durch Hitzekoagulation, auch bei Anwesenheit von Essigsäure, nicht gefällt werden. Sie gehören zum Typus der Albumosen und Peptone, die bei weiterer Einwirkung von Säuren natürlich verändert werden. Je nach der Beschaffenheit des Ausgangsmaterials und dem Einfluß der den Abbau bedingenden Faktoren mußte bei der Darstellung der Farbstoffe die erhaltene Menge und die Zusammensetzung der Stoffe eine verschiedene sein. Daher konnte es *Blyth* auch nicht gelingen, Bestimmungen des Gehaltes der Milch an seinem „Lactochrom" durchzuführen.

Da es uns klar geworden war, daß die isolierten Farbstoffe in keiner Beziehung zum Träger der Molkenfarbe standen, wurde ein neuer Versuch unternommen, den wirklichen Molkenfarbstoff zu gewinnen. Nach den gemachten Feststellungen mußte ein Verfahren angewendet werden, bei dem die Eiweißstoffe quantitativ entfernt und hohe Temperaturen sowie starke Säurekonzentrationen vermieden wurden.

Der einfachste Weg hierzu schien der zu sein, den Molkenfarbstoff ohne Anwendung irgendwelcher Agenzien in annehmbarer Konzentration in eine rein alkoholische Lösung überzuführen. Da weder Eiweißstoffe noch Milchzucker, deren Entfernung die erste Voraussetzung für die Gewinnung des Farbstoffs bilden mußte, in 96proz. Alkohol löslich sind, erschien dieser Weg gangbar.

Wichtig war ferner, ein geeignetes Ausgangsmaterial aufzufinden, das den Farbstoff in möglichst großer Konzentration enthielt, bei dem noch kein Abbau von Eiweißstoffen eingetreten sein konnte.

Die Verwendung von Milch als Ausgangsmaterial war wegen der großen Mengen der darin enthaltenen Eiweißstoffe und wegen des geringen Farbstoffgehalts nicht angebracht.

In der Käsereimolke finden sich zwar nur noch die Proteine des Serums, doch ist eben auch hier der Farbstoffgehalt zu gering. Deshalb wurde nun geprüft, ob sich nicht durch Einengen der Käsereimolke im Vakuum eine größere Farbstoffkonzentration erreichen ließe, ohne daß dabei ein Abbau der Eiweißstoffe eintrat.

Es wurde zunächst Molke eingedampft, aus der das Albumin durch Aufkochen entfernt war. Diese zeigte aber nach dem Einengen einen rötlichgelben Farbton, der nur von Eiweißabbauprodukten herrühren konnte.

Deshalb wurde gewöhnliche, nicht enteiweißte Käsereimolke auf ihr Verhalten beim Eindampfen im Vakuum geprüft. Bei dieser trat, wenn das Abdampfen sehr vorsichtig bei niederer Temperatur ausgeführt wurde, keine Veränderung des Farbtones auf. Die Molke behielt ihre ursprüngliche grüngelbe Farbe, nur wurde der Farbton entsprechend stärker. Nach Feststellung der günstigsten Konzentration, die bei einer Einengung auf 20° Bé lag, wurde dann die Neugewinnung des Farbstoffs aus frischer, so konzentrierter Käsereimolke vorgenommen.

13 Liter dieser Molke wurden mit dem doppelten Volumen 96 proz. Alkohols übergossen und 2 Tage unter Eiskühlung stehengelassen. Die ausgeschiedenen Eiweißstoffe wurden dann abzentrifugiert und die erhaltene, schön grüngelb gefärbte fluoreszierende Flüssigkeit filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum bei niederer, nie 40° übersteigender Temperatur bis zur Sirupkonsistenz eingeengt. Es wurde ein gelber grünstichiger Rückstand erhalten, der fünfmal mit gleichen Teilen 80 proz. Alkohols jeweils 2 Stunden lang ausgeschüttelt wurde. Die filtrierten, schön grüngelb gefärbten, fluoreszierenden Auszüge wurden vereinigt, im Vakuum bis zur Sirupdicke eingedampft und nochmals mit 96 proz. Alkohol ausgeschüttelt. Dieser Prozeß wurde dreimal wiederholt. Dabei blieben zum Schluß 37 g eines sirupartigen Rückstandes von den angewendeten 13 Litern Ausgangsmaterial, die 100 Litern frischer Molke entsprachen. Der Rückstand löste sich vollkommen klar in 96 proz. Alkohol. Seine Lösung besaß einen gelbgrünen, fluoreszierenden Farbton. Eine Prüfung ergab, daß der Rückstand kein Eiweiß mehr enthielt und daß er frei von Milchzucker war. Deshalb wurde dieser Farbstoffsirup als Rohprodukt für die Reindarstellung des Molkenfarbstoffs verwendet.

Die spektroskopische Untersuchung der wässerigen Lösung dieses Rohproduktes zeigte nur einseitige Absorption im blauen Teile des Spektrums; Absorptionsstreifen waren nicht vorhanden.

Durch Dialysierversuche wurde die nicht kolloide Natur des Farbstoffs festgestellt; er diffundierte gut durch Abderhaldenhülsen.

Es wurde nun versucht, den Farbstoffsirup zur Kristallisation zu bringen. Eine Prüfung der Löslichkeitsverhältnisse ergab, daß der Farbstoff in allen gebräuchlichen Lösungsmitteln sehr schwer löslich war, ausgenommen in Wasser und Alkohol.

Aus der rein alkoholischen Lösung ließ sich jedoch durch keine Kunstgriffe eine Kristallisation erzielen. Auch Versuche, die Kristallisation dadurch herbeizuführen, daß zu der alkoholischen Farbstofflösung Solvenzien hinzugesetzt wurden, in denen der Farbstoff schwer löslich war, führten zu keinem Ergebnis.

Es gelang aber, durch Versetzen der alkoholischen Farbstofflösung mit in Alkohol gelöster Pikrinsäure ein Pikrat herzustellen, das sich in einheitlicher, wohlcharakterisierter Form ausschied. Dieses Pikrat war nach dem Urteil des Herrn Dr. *Steinmetz*, München, mit keiner bisher kristallographisch festgelegten Pikrinsäureverbindung identisch.

Auf Grund dieser augenscheinlich basischen Eigenschaften des Farbstoffs wurde nun versucht, durch Zusatz von alkoholischer 3proz. Salzsäure zur Lösung des Farbstoffs in Alkohol ein Chlorid des Farbstoffs darzustellen. Nach dem Verdunsten der sehr verdünnten Lösung kristallisierte auch ein gelber, einheitlich aussehender, aus gut ausgebildeten Oktaedern mit abgestumpften Ecken bestehender Körper aus. Dieser erwies sich jedoch bei näherer Untersuchung als Natriumchlorid, das durch den aufgenommenen Farbstoff gefärbt war.

Es mußten also noch größere Mengen von Begleitstoffen in dem Farbstoffsirup enthalten sein. Dies bestätigte sich auch durch die weitere Untersuchung. Eine Probe des Farbstoffsirups hinterließ beim Verbrennen einen graugrün gefärbten Rückstand von anorganischen Salzen. Der Stickstoff des Farbstoffsirups war zum überwiegenden Teil organisch gebunden, ein Viertel des Stickstoffgehalts war in Ammoniakbindung vorhanden.

Zur Orientierung über die chemische Natur des in dem Farbstoffsirup allem Anschein nach angereicherten Pigmentes wurden folgende Reaktionen angestellt:

1. Biuretprobe: negativ.
2. Hitzekoagulation: negativ.
3. Xanthoproteinprobe (aromatische Eiweißbausteine, wie Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan): positiv.
4. Glyoxylsäureprobe (Tryptophan): negativ.
5. *Millons* Probe (Thyrosin): schwach positiv.
6. Bromwasserprobe (freies Tryptophan): negativ.

7. Murexidprobe (Harnsäure): negativ.
8. *Gmelin*sche Probe (Gallenfarbstoffe): negativ.
9. *Pettenkofer*sche Probe (Gallensäure): negativ.
10. Urobilinprobe (Ansäuern mit Salzsäure, Ausschütteln mit Amylalkohol und spektroskopische Prüfung): kein Urobilinspektrum; bei Zugabe einer 1proz. Lösung von Zinkchlorid in stark ammoniakalischem Alkohol: keine Vertiefung der an sich vorhandenen grünstichigen Fluoreszenz.

Um nun die fremden Beimengungen aus dem Farbstoffsirup zu entfernen, wurde nochmals versucht, ihn durch Umlösen zu reinigen. Es ergab sich schließlich, daß er wohl in reinem Chloroform schwer löslich, aber in einem Gemenge von Chloroform und Alkohol löslich war.

Deshalb wurde der Rest des Farbstoffsirups mit der vierfachen Menge einer Mischung von 2 Teilen Chloroform und 1 Teil 96proz. Alkohols eine halbe Stunde lang unter Erwärmen im Wasserbade ausgeschüttelt und diese Ausschüttelung viermal wiederholt. Die erhaltenen Auszüge wurden vereinigt und im Vakuum eingedampft. Der wieder sirupartige Rückstand konnte nun mit der achtfachen Menge einer Mischung von 8 Teilen Chloroform und 1 Teil Alkohol aufgenommen werden. Diese Lösung wurde im Vakuumexsikkator über einer durch Zusammenschmelzen festen und flüssigen Paraffins hergestellten Trockenmasse (Absorption von Chloroform) zur Verdunstung gebracht. Beim Stehen über Nacht ging der Exsikkator aber in Trümmer, und es konnte leider nur ein Teil des Farbstoffs gerettet werden. Dieser wurde nach der gleichen Methode näher untersucht, wie die später beschriebenen und nach vereinfachten Verfahren gewonnenen Farbstoffe.

Durch die vorgenommene Reinigung war der Farbstoffsirup von den anorganischen Beimengungen befreit. Seine weitere eingehende Prüfung ergab:

1. das Vorhandensein von Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Sauerstoff; Schwefel war weder als oxydierter saurer Schwefel, noch als unvollkommen oxydierter neutraler Schwefel vorhanden; es war kein Phosphor anwesend.
2. *Fehling*sche Probe: negativ.
3. Biuretprobe: negativ.
4. Hitzekoagulation: negativ.
5. Aussalzbarkeit mit Ammoniumsulfat: negativ.
6. *Heller*sche Probe: negativ.
7. Sulfosalicylsäureprobe: negativ.
8. *Esbach*-Probe: negativ.
9. Tanninprobe: negativ.
10. Xanthoproteinprobe (aromatische Eiweißbausteine): positiv.
11. *Millon*sche Probe (Tyrosin): schwach positiv.
12. Glyoxylsäureprobe (Tryptophan): negativ.

13. Bromwasserprobe (freies Tryptophan): negativ.
14. Kreatin: negativ.
15. Kreatinin: negativ.
16. Harnsäure: negativ.
17. Harnstoff: negativ.
18. Cholesterin: negativ.
19. *P. Ehrlich*sche Aldehydprobe (Paradimethylaminobenzaldehyd, hauptsächlich auf tryptophanhaltige Körper): schwach positiv.
20. *P. Ehrlich*sche Diazoprobe (mit Diazobenzolsulfosäure und mit Diazobenzolchlorid, auf Urochrom bzw. Urochromogen bzw. Antoxyproteinsäuren, histidin- und tyrosinhaltige Stoffe): negativ.
21. Mit sehr verdünnter Ferrichloridlösung: Braunrotfärbung.
22. Pyrrolprobe: negativ.
23. Spektroskopische Prüfung: keine Anzeichen für Urobilin.
24. Spektroskopische Prüfung mit aktiviertem Acetaldehyd [*Garrod*sche Urochromprobe[1])]: negativ. Das Spektrum zeigt keinerlei charakteristisches Aussehen, nur diffuse Absorption vom violetten Ende herein.
25. *Heflebowers* Urochromogenprobe (1 ccm Farbstofflösung mit der doppelten Menge Wasser verdünnt und Hinzugabe von 3 Tropfen einer 1proz. $KMnO_4$-Lösung; es soll eine Gelbfärbung entstehen)[2]): negativ.
26. *Weiss*sche Urochromogenprobe (ähnlich der *Heflebower*schen Probe, die auf die *Weiss*schen Untersuchungen zurückgeht)[3]): negativ. *Weiss*sche Phenylacetylprobe (Kochen mit einem Körnchen $K_2Cr_2O_7$ und 25 Proz. H_2SO_4: Geruch nach Phenylacetylaldehyd; Phenylalaninkern): positiv.
27. Verhalten gegen Schwermetallsalze:
    $AgNO_3$: Fällung.
    Ammoniakalische Silberlösung: Reduktion schon in der Kälte.
    Hg-Acetat in schwach saurer Lösung: Fällung.
    Hg-Acetat in schwach sodaalkalischer Lösung: Fällung.
    $HgCl_2$ (wässerige Lösung): negativ.
    $HgCl_2$ (alkoholische Lösung): negativ.
    Cu-Salze: Fällung, verhältnismäßig leicht löslich.
    Cd-Salze: negativ.
    Ni-Salze: negativ.
    Co-Salze: negativ.
    Ba-Salze: negativ.
    Ba-Salze plus Alkohol: Fällung.
    Phosphorwolframsäure: Fällung, in schwacher Säure leicht löslich.
    Phosphormolybdänsäure: Fällung, in schwacher Säure leicht löslich.
    Basisches Bleiacetat: Fällung.

---

[1]) *A. E. Garrod*, Journ. of Physiol. 29, 335, 1903.

[2]) *Heflebower*, Amer. Journ. of med. scienc., Februar 1912.

[3]) *M. Weiss*, Beitr. z. Klin. d. Tuberkulose 1907, S. 177; Wien. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 33. Weitere zusammenfassende Literatur hierüber: *M. Weiss*, Neuere Harnuntersuchungsmethoden und ihre klinische Bedeutung. Berlin 1922.

Lösungsmittel: *Unlöslich* in absolutem Alkohol, Amylalkohol, Aceton, Benzol, Chloroform, Petroläther, Äther, Essigäther, Essigester; *löslich* in Wasser, verdünntem Alkohol, Methylalkohol, Gemischen von Chloroform und Alkohol.
Methylalkoholische Lösung mit Cu-Acetat: Fällung.
Jodjodkaliumlösung: negativ.
Jodquecksilberkaliumjodid: negativ.

28. Beim Erhitzen mit Säuren: Braun- und Schwarzfärbung unter Bildung eines amorphen, schwarzen Niederschlages = Melanin („Lacto-Melanin").
29. Eigenschaften einer freien Säure: Rotfärbung von Lackmus; Vertiefung des Farbtones durch Alkalien; Abblasen durch Säuren.
30. Verbleichen am grellen Lichte unter Zersetzung (Bildung eines schwarzen Niederschlages).
31. Für die Hydrolyse verblieb leider zu wenig Ausgangsmaterial. Es konnte nur eine abgekürzte Hydrolyse (20proz. HCl) durchgeführt werden, die aber mangels genügender Menge in der Deutung der Ergebnisse natürlich nicht zuviel Schlüsse zuläßt; wir müssen deshalb verzichten, hier darauf einzugehen. Das gleiche gilt für die Bestimmung des Aminostickstoffs von *Sörensen*; die durch diese Methode erfaßbaren NH_2-Gruppen sind jedenfalls relativ reichlich vorhanden. Mit diesen beiden Methoden hätten spätere Untersuchungen hauptsächlich zu arbeiten.

Überblickt man die Ergebnisse der Prüfung, so fallen vor allem die ungewöhnlich wenig ausgeprägten Eigenschaften des Farbstoffs auf. Die spektroskopische Methode, die sonst bei Arbeiten mit tierischen Farbstoffen eine große Führerin ist, versagt hier leider ganz; es fehlen auch charakteristische Farbveränderungen und Fällungen. Deshalb handelt es sich in erster Linie um eine Indizien- und Alibibeweisführung. Mit Urobilin hat der von uns isolierte Farbstoff „Lactochrom" nichts zu tun; wir stehen damit in Widerspruch mit der Arbeit von *Desmoulière* und *Gautrelet* (l. c.), die allerdings selbst die Identität ihres „Lactochroms" mit Urobilin nicht als durchaus erwiesen ansehen. Ein alkaloidartiger Stoff im Sinne der Arbeit von *A. W. Blyth* (l. c.) liegt ebenfalls nicht vor. Am nächsten kommen wir mit unserer Untersuchung der Anschauung von *S. Palmer* und *H. Cooledge* (l. c.), die ihr Lactochrom als Urochrom ansahen, also der Anschauung waren, daß der gelbgrüne, wasserlösliche Farbstoff der Milch mit dem gelben normalen Farbstoff des Harns identisch ist.

Wir möchten selbst noch kein Urteil abgeben, fassen aber unsere Anschauung dahin zusammen, daß wir unser Lactochrom den *Proteinsäuren* zuzählen. Über diese sind bekanntlich in den letzten Jahren verschiedene Arbeiten entstanden, die sich mit den Proteinsäuren des Harnes beschäftigen. Nach den derzeitig geltenden Anschauungen lassen sich folgende, wahrscheinlich nahe miteinander verwandte Körper unterscheiden:

Antoxyproteinsäure, Oxyproteinsäure und Alloxyproteinsäure[1]).

Sie sollen ständige Inhaltsstoffe auch des normalen Harnes sein; bei gewissen pathologischen Erscheinungen soll ihr Anteil vermehrt sein.

Die erwähnten Verbindungen, über deren Zusammensetzung man noch nicht im klaren ist, sind dadurch ausgezeichnet, daß sie ein hohes Molekulargewicht besitzen, Säuren sind und in Wasser lösliche, in Alkohol unlösliche Bariumsalze geben; sie sind fällbar durch Quecksilberacetat. Zur Beurteilung der Stellung dieser Produkte zum Eiweiß, zu den Peptonen und Polypeptiden ist es von größter Wichtigkeit, daß sie die Biuretreaktion nicht geben; auch die für die einzelnen Aminosäuren charakteristischen Farbreaktionen fallen zumeist negativ aus. Es ist bis jetzt noch nicht gelungen, den einwandsfreien Nachweis zu führen, daß an ihrem Aufbau unveränderte Aminosäuren beteiligt sind.

Wie schon erwähnt, ist überhaupt die chemische Natur der genannten Stoffe noch nicht geklärt, zumal auch der Nachweis noch nicht geführt werden konnte, daß sie einheitlich sind. Man faßt sie zurzeit als weitgehend umgewandelte Abbaustufen der Proteine auf, es wird aber auch gelegentlich die Anschauung vertreten, daß sie durch Aufbau aus Spaltstücken bestimmter Aminosäuren entstanden angesehen werden können.

Neueste Untersuchungen zeigen, daß die sogenannte Oxyproteinsäure (wegen ihres verhältnismäßig hohen Sauerstoffgehalts) mit der „Antoxyproteinsäure" und der „Alloxyproteinsäure" wenig Züge gemeinsam hat; sie bedarf noch besonderer Bearbeitung. Klarere Beziehungen bestehen schon zwischen den beiden anderen Proteinsäuren. *Weiss* (l. c.) hat nämlich gefunden, daß der Träger der *Ehrlich*-

[1]) *St. Boudzynski* und *R. Gottlieb*, Zentralbl. f. d. med. Wiss. **33**, 577, 1897; *St. Boudzynski* und *K. Pauck*, Bull. de l'acad. des sciences de Cracocie Octobre 1902; Ber. d. deutsch. chem. Ges. **35**, 2959, 1902; *St. Boudzynski*, *St. Dombrowski* und *K. Pauck*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**, 83, 1905; *Fritz Pregl*, Pflügers Arch. **75**, 87, 1899; *Wilhelm Ginsberg*, Hofmeisters Beitr. **10**, 411, 1907; *W. Czernecki*, Anzeigen der Akademie der Wissenschaften Krakau 1910, S. 400; *M. Weiss*, diese Zeitschr. **27**, 175, 1910; *E. Freund* und *R. Fellner*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 401—406; *J. Browinski* und *St. Dombrowski*, ebenda **77**, 92—106; *P. Glagolew*, ebenda **89**, 432—440; *R. S. Sana*, diese Zeitschr. **64**, 195—221; *O. v. Fürth*, ebenda **69**, 448—460; *M. Damask*, Wien. klin. Wochenschr. **28**, 499—502; *A. Madinaveitia*, Ann. soc. espanola Fis. Quim. **17**, II, 136—145; *S. Edelbacher*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **120**, 71—84; **121**, 164, **127**, 187—189; *E. Freund* und *A. Sittenberger*, diese Zeitschr. **136**, 145; ferner noch *M. Weiss*, Nähere Harnuntersuchungsmethoden und ihre klinische Bedeutung. Berlin 1922. In dieser Schrift ist auch näher auf die fortlaufenden Arbeiten des Verfassers hingewiesen, die für die Beurteilung der Angelegenheit von Wichtigkeit sind.

schen Diazoreaktion das *Urochromogen* ist, eine farblose Vorstufe des normalen gelben Harnfarbstoffs, der durch Oxydation in Urochrom übergeht. Das Urochromogen soll sich aber nur unter pathologischen Verhältnissen im Harn vorfinden; der normale Harn soll gleich den oxydierten Farbstoff enthalten. Über das Urochrom ist schon viel gearbeitet worden[1]; wir können hier nur sagen, daß es nach den neueren Anschauungen zu der durch Bleiessig fällbaren Alloxyproteinsäurefraktion zu zählen ist, während das Urochromogen, die unter normalen Umständen nicht beobachtbare Muttersubstanz, zu der sauerstoffreicheren Alloxyproteinsäurefraktion gerechnet werden kann.

Unterzieht man nun das von uns isolierte „Lactochrom" einer näheren Betrachtung, so hat man es wohl ohne Zweifel mit einem Abkömmling des Körpereiweißzerfalls zu tun; es hat Phenolcharakter und die Eigenschaften einer starken Säure. Für den Grundkern des Lactochroms möchten wir aus der Xanthoproteinprobe auf das Vorhandensein von aromatischen Verbindungen schließen. Die genannte Reaktion wäre für Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin kennzeichnend. Die negative *Millon*sche Probe ergab nun das wahrscheinliche Fehlen von Tyrosin, die negative Glyoxylschwefelsäureprobe das Fehlen von Tryptophan, so daß wohl Phenylalanin als ein wesentlicher Bestandteil des Lactochroms angesehen werden kann. Eine Bestärkung dieser Anschauung liegt in der positiven Phenylacetylprobe, die auch auf Phenylalanin hinweist. Bezeichnend ist ferner die chromogene Tendenz des Körpers = Lactomelaninbildung, was schon auf eine enge Beziehung zu der wahrscheinlichen Muttersubstanz der Pigmente, dem Dioxyphenylalanin[2]), schließen läßt. Charakteristisch ist die grüngelbe Farbe mit ausgesprochener Fluoreszenz, aber ohne typische und bemerkenswerte Auslöschungserscheinungen im Spektrum. Diese spektroskopische Trägheit kann auch nicht mit besonderen Kunstgriffen (Zinksalze, „aktiver" Acetaldehyd) verändert werden.

Läßt sich auch so manche enge Beziehung zu unserem Lactochrom und dem normalen gelben Harnfarbstoff Urochrom feststellen, so fehlt doch ein wesentliches Glied in der Beweisführung in der genannten Richtung: das Ausbleiben der spezifischen Urochrom(ogen)probe nach *M. Weiss*. Es kann zwar durch Bilirubin und Urobilinogen, wenn diese Stoffe angereichert vorkommen, die *M. Weiss*sche Urochrom(ogen)-probe gestört werden. Bilirubin reagiert nämlich mit $KMnO_4$ unter

---

[1]) *U. A. Thudichum*, Journ. f. prakt. Chem. **104**, 257, 1864; *A. E. Garrod*, Proced. of the Royal. Soc. **55**, 394, 1894; *St. Dombrowski*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**, 390, 1908; *H. Hohlweg*, diese Zeitschr. **13**, 199, 1908; *K. E. Salomonson*, ebendaselbst **13**, 205, 1908.

[2]) *E. Bloch*, Das Problem der Pigmentbildung. Arch. f. Dermatol. **124**, 1917; Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**, 1917.

Oxydation zu einem farblosen Körper; Urobilinogen liefert bei der gleichen Behandlung einen rötlichen Farbstoff[1]). Man kann aber diese Stoffe abtrennen (Aussalzen mit Ammonsulfat); übrigens war in unserer Farbstofflösung kein Bilirubin und Urobilinogen vorhanden. Es könnte nun noch sein, daß der Eintritt der Reaktion durch zu große Acidität verhindert wurde. Sie tritt nämlich, auf die Verhältnisse des Harns berechnet, nur bei der nativ sauren Harnreaktion ein, während Ansäuern sie verhindert. Ferner kann gegen den Versuch, das „Lactochrom" mit dem Urochrom zu identifizieren, ins Feld geführt werden, daß das Urochrom meist als eine schwefelhaltige Substanz angesehen wird, wie ja auch die Proteinsäuren mit einem S-Gehalt ausgewiesen werden. Neueste Bearbeitungen des Urochroms[2]) ergaben keinen Schwefelgehalt mehr und es hat den Anschein, als ob der S-Gehalt der Proteinsäuren nur bedingt richtig ist, nämlich von Verunreinigungen herstammt, worauf schon *Salkowski* hingewiesen hat.

Nach dem Vorgesagten können wir daher mit guter Wahrscheinlichkeit aussprechen, daß der genuine, wasserlösliche, gelbgrüne Farbstoff der Milch ein Phenylalaninabkömmling ist, in enger Beziehung zum Urochromogen und Urochrom steht, zu der Alloxyproteinsäurefraktion gehört, jedoch vorläufig von dem typischen Urochromogen bzw. Urochrom unterschieden werden muß. Mit Urobilin hat es nichts zu tun (*Desmoulière* und *Gautrelet*); das von *Blyth* seinerzeit hergestellte Lactochrom ist als ein Kunstprodukt anzusehen. Wir schließen uns der Ansicht von *S. Palmer* und *H. Cooledge* in der Hauptsache dahingehend an, daß der Farbstoffgehalt der genuinen Milch von zwei gänzlich voneinander verschiedenen Farbstoffen bestritten wird: einem lipoidlöslichen Farbstoff, der sich bei der Butterung dem Milchfett mitteilt (zur Gruppe der Carotine gehörig und unmittelbar von der vegetabilischen Futtersubstanz stammend, während der Grünfütterung mehr angereichert als während der Trockenfütterung), und dem gelbgrünen, wasserlöslichen Lactochrom, einem dem Urochrom nahestehenden, aber mit ihm nicht identischen hochmolekularen Abbauprodukt des Proteins (Körpereiweißzerfall) von phenolischem Charakter, wahrscheinlich mehrfach hydroxyliert und in seinem Aufbau Phenylalaninkomplexe enthaltend.

Mit dieser Anschauung trifft man auch gut mit der Ansicht *K. T. Pelkans* (l. c.) zusammen, der durch künstlichen Abbau von

[1]) *M. Weiss*, Wien. Arch. f. klin. Med. **1**, 359, 1920; Wien. klin. Wochenschr. **1916**, Nr. 15.

[2]) *H. Hohlweg*, diese Zeitschr. **13**, 199, 1908; *K. E. Salomonsen*, ebendaselbst **13**, 205, 1908; *Mancini*, ebendaselbst **13**, 208, 1908; *H. Liebermann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **52**, 129, 1907.

Casein zu einem Farbstoff gekommen ist, den er Protochrom nannte und der ebenfalls dem Urochrom recht nahestand.

Mangels genauer Belege müssen wir darauf verzichten, Angaben über die Menge von Lactochrom, wie sie sich in der Milch vorfinden, zu machen. Wir haben schon erwähnt, daß nach unserer eingehenden Beobachtung die Färbung des Milchserums während des ganzen Jahres hindurch gleich ist, daß also beim Lactochrom die Mengenverhältnisse nicht von der Art der Fütterung abhängig sind; sie mögen wohl von der Menge des Futters abhängig sein, aber dieser Unterschied gleicht sich bei der Durchschnittsmilch, wie wir sie zur Beobachtung bekamen, aus. Auf Grund von unverbindlichen Schätzungen, die wir mit Lactochromlösungen, deren Gehalt an Stickstoff und Farbstoff annähernd bekannt war, zusammen mit Milchseren durchführten, möchten wir den Stickstoffanteil, den das Lactochrom zu den Stickstoffbestandteilen der Milch liefert, auf etwa 2 Proz. angeben; das würde also bei dem Durchschnittsgesamtstickstoffgehalt von 500 mg in 100 ccm etwa 10 mg Farbstoffstickstoff pro 100 ccm Milch bedeuten; dieser Stickstoffanteil steckt zum größten Teil in der Phosphorwolframsäurefällung, die wir als „Peptonstickstoff“ bezeichnet haben. Es handelt sich aber nur um eine vorläufige Schätzung; es kann auch mehr Farbstoffstickstoff vorhanden sein, so daß sich dementsprechend der eigentliche Peptonstickstoff verringern würde.

Nach diesen Feststellungen wäre es nun eine dankenswerte Aufgabe, das echte Lactochrom in größerer Menge zu isolieren, um es dann noch näher studieren zu können. Vor allem wäre es wichtig, den Farbstoff zur Kristallisation zu bringen; allerdings erscheint eine Möglichkeit hierzu bei dem hochmolekularen, den Proteinen noch nahestehenden Charakter vorläufig als recht unwahrscheinlich.

Für unsere eigenen späteren Arbeiten, die wir uns noch einige Zeit vorbehalten, geben wir nun noch eine Methode an, die es gestattet, unter größter Schonung und mit der Aussicht auf Erfolg größere Mengen von genuinem Lactochrom zu gewinnen. Voraussetzung hierfür ist natürlich die Verarbeitungsmöglichkeit von großen Mengen frischer Milch.

Diese wird in üblicher Weise durch Labung verkäst, das Labserum im Hochvakuum auf ein Drittel des Ausgangsvolumens (10° Bé) eingedampft und die konzentrierte Molke einer gut und schnell wirkenden Dialyse unterworfen. Hierfür eignet sich am besten der sogenannte Schnelldialysator nach *Schieber*, der in einer ungleich kürzeren Zeit arbeitet, wie die sonst gebräuchlichen Dialysierapparate.

Um die ausgezeichnete Wirkungsweise des Schnelldialysators zu zeigen, schildern wir den Verlauf einer Dialyse:

750 ccm konzentrierten Milchserums wurden in den Pergamentbeutel gebracht und gegen 2 1/4 Liter Wasser dialysiert. Serum und Wasser hatten eine Temperatur von etwa 25°. Nach dem gegen 10 Uhr morgens erfolgten Ansatz der Dialyse wurde die Apparatur 9 Stunden, also bis 7 Uhr abends, in Betrieb gehalten und alsdann so über Nacht stehengelassen. Das erhaltene Dialysat hatte eine intensiv gelbgrüne Farbe und eine Salzkonzentration von 2,5° Bé, also Molkenkonzentration. Die durch aufgenommenes Wasser etwa 1,1 Liter betragende Molkenflüssigkeit war fast farblos geworden. Dieses außerordentlich günstige Ergebnis bestätigte sich bei mehrfach wiederholten Versuchen.

Wir gingen bei unseren Isolierungsarbeiten weit über das Maß des Schnelldialysators hinaus. Durch das freundliche Entgegenkommen der Leitung der Großmolkerei, in deren Räumen die Arbeiten vorgenommen wurden — sie können nur dort aus Rohstoffgründen durchgeführt werden —, wurden wir in die Lage versetzt, eine Batterie von großen Schnelldialysatoren zu benutzen, mit der jeweils auf einen Schlag und in ganz gleichmäßiger Weise 120 Liter Milch bzw. das daraus hergestellte Serum in Angriff genommen werden konnten. Die Abb. 2 gibt über diesen Apparat Aufschluß; er ist nach den Grundsätzen des Laboratoriums-Schnelldialysators nach *Schieber* aufgebaut, weshalb seine Anwendung den Schutzrechten unterliegt, die auf diesem Geräte ruhen.

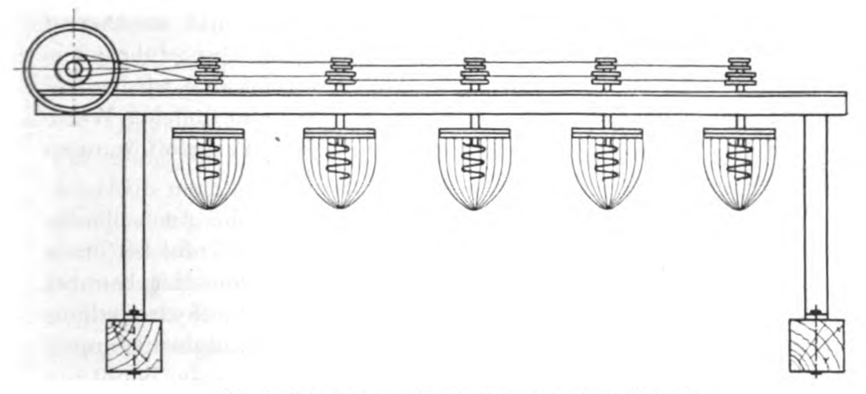


Abb. 2. Rührdialysator für Großnutzung (Maßstab 1 : 20).

Anstatt des Glasgestelles, über das die Dialysiermembran beim kleinen Apparat gespannt wird, wurde für die große Apparatur ein Drahtgerüst verwendet. Nach dem Überspannen des als Membran verwendeten Dialysierpapiers über dieses Drahtgerüst entsteht beim Einfüllen von Flüssigkeit ein kugeliger Pergamentbeutel, der etwa 6 Liter faßt. Er läßt sich trotz seiner Größe gefahrlos in Drehung

versetzen, nachdem durch viele Versuche eine zweckmäßige Ausgestaltung des Drahtgerüstes gefunden war. Zur Aufnahme des als Außenflüssigkeit dienenden Wassers sind Gefäße von einem Fassungsvermögen von etwa 20 Litern nötig; zur Erzielung einer guten Ausbeute ist unbedingt das richtige Verhältnis zwischen zu dialysierender Flüssigkeit und Außenwasser innezuhalten.

Mit Hilfe dieser Großapparatur läßt sich ziemlich bequem und, was die Hauptsache ist, sehr schonend und schnell aus großen Mengen Milch der wasserlösliche Farbstoff extrahieren. Für die weitere Verarbeitung des Dialysats stehen verschiedene Wege offen. Man kann im Vakuum konzentrieren und die Konzentrate mit dem Gemisch von Chloroform und Alkohol extrahieren und diese Extrakte wieder vorsichtig eindampfen, um sie mit Benzol zur Entfernung von darin löslichen Substanzen (z. B. Cholesterin) zu behandeln. Das konzentrierte wässerige Dialysat wird vor der Extraktion mit Chloroform und Alkohol sorgfältig mit festem Ammonsulfat ausgesalzen.

Durch die geschilderte Behandlung erhielt man ein Rohprodukt, das noch einer weiteren Aufarbeitung bedarf. Man kann für diese Aufarbeitung die Fällbarkeit des Farbstoffs durch Bleiacetat benutzen oder man folgt noch besser einem Vorschlag von Herrn Prof. Dr. *H. Fischer*, München, dem wir für seine ausgezeichnete Beratung bestens danken, den Farbstoff durch Adsorption auf Kolloiden niederzuschlagen. Benutzt man den dritten Weg, so wird der durch Bleiessig bei Gegenwart eines großen Überschusses von Ammoniak annähernd quantitativ fällbare Farbstoff in die Bleiverbindung übergeführt; aus dieser Verbindung wird der Farbstoff durch Schwefelsäure wieder frei gemacht, worauf die Schwefelsäurelösung mit Baryt in üblicher Weise behandelt wird. Man erhält so sehr reine Farbstofflösungen (*H. Fischer*).

Für die Adsorption auf Kolloiden eignet sich sehr gut kolloides Aluminiumhydroxyd, wie es von *R. Willstätter* und *H. Kraut* bei ihren bekannten Fermentarbeiten zur Isolierung von Fermenten benutzt wurde. Der Zustand des zu verwendenden Aluminiumhydroxydgels ist wesentlich; es gibt bekanntlich je nach den Fällungsbedingungen verschieden dichte Gele [bezüglich der Einzelheiten über die Bereitung wird auf die Originalliteratur hingewiesen[1])]. Recht brauchbar und praktisch, weil es die etwas umständliche und sorgfältig durchzuführende Bereitung des Gels unnötig macht, ist auch in unserem Falle das sogenannte Aluminium oxydatum hydricum *Merck* in Teigform, das ohne Mühe beschaffbar ist, so daß auch mit größeren Mengen hantiert werden

[1]) *R. Willstätter* und *H. Kraut*, Ber. 56, 149, 1923.

kann. Am günstigsten liegen die Adsorptionsverhältnisse bei dem nach *R. Willstätter* und *H. Kraut* hergestellten Aluminiumhydroxydgel B, das bei einer einmaligen Ausschüttelung aus wässerigen Lösungen von Lactochrom jeweils wenigstens zwei Drittel der vorhandenen Farbstoffmenge an sich nimmt; kolorimetrische Messungen ermöglichen eine einfache Kontrolle. Aus der Adsorptionsverbindung läßt sich dann der Farbsotff durch Alkohol oder Ammoniak oder ein Gemisch von beiden ausziehen. Der Vorgang läßt sich natürlich zur Erhöhung des Reinigungseffektes wiederholen. Vermutlich läßt sich der Dialyse- und der Adsorptionsvorgang vereinigen, indem man das Prinzip der Elektrodialyse anwendet; doch haben wir darüber vorläufig noch keine Erfahrungen.

Wie schon gesagt, behalten wir uns die Schlußbearbeitung der Lactochromfrage noch vor, nachdem uns nun der Weg bekannt ist, auf dem sich auf die eine oder andere Weise aus großen Mengen Milch ausreichende Mengen von reinem Farbstoff gewinnen lassen. Es wird vielleicht dann doch noch möglich sein, die prozentuale Elementarzusammensetzung des Lactochroms zu ermitteln; Hoffnungen, den Farbstoff zur Kristallisation zu bringen, dürfen wir allerdings nicht haben.

Wir werden dann auch noch versuchen, durch Hydrolyse und Formoltitration über die Bausteine des polypeptidartigen Lactochroms Aufklärung zu erhalten.

Einige bisher wenig oder nicht bearbeitete Mineralstoffe der Milch (Salzbestandteile).

Unter dem Gesichtspunkte, die Milch als ein Objekt biochemischer Forschung aufzufassen und zu bearbeiten, kommen auch einige, allem Anschein nach normale Bestandteile der Milch zur Geltung, die bisher wenig oder keine Beachtung gefunden haben. Sie gehören zu der Gruppe der Mineral- oder salzigen Bestandteile der Milch; sie können willkommene Hinweise auf die Biogenese der Milch liefern, da sie in Beziehung zu den Mineral- und salzigen Bestandteilen des Blutes, anderer Körperflüssigkeiten und von Exkreten und Sekreten zu bringen sind.

Wir bearbeiteten das normale Vorkommen in der Milch an Aluminium, Mangan, Silicium und Jod sowie von Rhodaniden. Es würde hier zu weit führen, über die Einzelheiten der Untersuchungen zu berichten; wir wollen nur sagen, daß Aluminium- und Mangansalze ständig in jeder Milch vorkommen, erstere in sehr geringer Menge, letztere in recht beträchtlicher und bemerkenswerter Menge, daß Silicate ebenfalls ständig in der Milch zu beobachten sind, daß ferner Jod in Form von Jodiden auch ein konstanter, in seinen Mengen jedoch

sehr schwankender Bestandteil ist und daß schließlich auch Rhodanide als konstanter Inhaltsstoff in der Milch anzutreffen sind. Wir werden an anderer Stelle über die Einzelheiten der Arbeiten berichten, wobei auch auf das Vorhandensein der genannten Stoffe in anderen Körperflüssigkeiten einzugehen ist.

Hier in dieser Arbeit, in der von den stickstoffhaltigen Bestandteilen der Milch die Rede ist, interessiert vor allem das Rhodanvorkommen.

Die Rhodanwasserstoffsäure wurde zuerst in geringer Menge im Harn der Menschen, von Pferden, Rindern, Hunden, Katzen und Kaninchen, später im Parotis- und Submaxillarisspeichel der Menschen und mancher Tiere und auch im Magensaft der Hunde und Katzen aufgefunden. Die Mengen sind jeweils klein bis sehr klein. Beispielsweise werden mit dem Harn des Menschen innerhalb von 24 Stunden durchschnittlich 30 bis 50 mg Rhodankali ausgeschieden.

Zahlenangaben aus früherer Zeit bedürfen einer Nachprüfung, da die Bestimmungsmethodik sehr fehlerhaft war. Sie wurde durch die erheblich verbesserte Methode von *J. Munk*[1]) gesichert. Nach diesem Verfahren erhält man auch höhere Werte, beispielsweise im Menschenharn pro Tag den Wert von durchschnittlich 100 bis 120 mg. Für qualitativen und in geeigneten Fällen auch quantitativen Nachweis ist die schöne kolorimetrische Methode nach *Authenrieth* und *A. Funk*[2]) sehr praktisch. Man verwendet hierbei das bekannte *W. Authenrieth-Königsberger*sche Kolorimeter mit einem geeichten Rhodankeil. Man kann noch 0,1 mg Rhodankalium nach Überführung in Ferrirhodanid in 10 ccm Flüssigkeit erkennen. Charakteristisch ist auch der qualitative Nachweis für Rhodanide nach *G. Spacu*[3]). Das Wesen dieses Nachweises liegt in der Entstehung einer hellgrünen Fällung, wenn die Lösung, die ein Rhodanid enthält, mit einigen Tropfen Pyridin und einigen Tropfen einer neutralen Lösung eines Kupfersalzes versetzt wird. Es bildet sich eine in Wasser sehr schwer lösliche komplexe Kupfer-Pyridin-Rhodanverbindung. Der Nachweis kann noch empfindlicher gemacht werden, wenn man vor der Bildung des Niederschlages einige Tropfen Chloroform hinzugibt, in dem die genannte komplexe, in Wasser, wie gesagt, schwer lösliche Verbindung mit smaragdgrüner Farbe sich löst.

Für den quantitativen Nachweis ist man auf die Methode von *J. Munk* (l. c.) angewiesen (für den Fall, daß die kolorimetrische Methode von *W. Authenrieth* nicht angängig ist), die darin besteht,

[1]) *J. Munk*, Deutsch. med. Wochenschr. 1876, S. 146.
[2]) *W. Authenrieth* und *A. Funk*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **52**, 137—167.
[3]) *G. Spacu*, Buletinul Societatii de Stiinte din Cluj **1**, 284—291, 1923.

daß die auf Rhodan zu prüfende Flüssigkeit mit Salpetersäure angesäuert wird, worauf man mit Silbernitrat die Chloride und Rhodanide fällt. Der Silberniederschlag wird nach dem Auswaschen und Trocknen mit Salpeter und Soda geglüht und schließlich die aus dem Schwefel der Rhodanwasserstoffsäure gebildete Schwefelsäure in bekannter Weise bestimmt (1 Teil $BaSO_4$ = 0,253 Rhodanwasserstoffsäure).

Veranlassung zu unseren Arbeiten über das Vorkommen von Rhodaniden in der Milch boten verschiedene Umstände:

a) eine alte Angabe von *Musso*, nach der in der Milch 2 bis 5 mg Rhodannatrium in je 1 Liter vorhanden sein sollen[1]);

b) Beitrag allenfalls vorhandener Rhodanide zum Reststickstoff der Milch;

c) besondere, auch anderweitig festgestellte Beobachtungen, daß die Rhodanide in ganz besonderer Weise dispergierend, peptisierend auf lyophobe Eiweißstoffe und Eiweißabkömmlinge einwirken (Beziehungen zum Eiweißstoffwechsel).

Genuine Milch und Milchserum (Lab- und Sauerserum, Molke) ergaben keine positiven Rhodanreaktionen. Die Menge an Rhodanid war entweder zu geringfügig oder Begleitstoffe störten; wahrscheinlich schien beides zu sein. Enteiweißungsmethoden mit Phosphorwolframsäure, Uranylacetat, anderen Schwermetallsalzen, mit Trichloressigsäure, mit Metaphosphorsäure wollten wir nicht anwenden, da der Überschuß der Fällungsmittel die sehr empfindliche Rhodanidreaktion gestört hätte. Wir stellten deshalb wieder aus frischer Durchschnittsmilch, wie bei den Reststickstoffbestimmungen, ein Essigsäureserum her, das in beliebiger Menge zu haben war, und dampften dieses Serum auf dem Wasserbade ein, so daß schließlich ein eingedicktes Serum vorlag. Mit diesem so vorbereiteten Serum erhielten wir nach *Authenrieth* eine Rotfärbung, die auch durch einen positiven Ausfall der *Spacu*schen Probe einen Beleg fand.

Für die quantitative Bestimmung mußten wir uns der *Authenrieth*schen Methode, trotz der Erschwerung durch die vermutliche Gegenwart von Spuren an Essigsäure, bedienen. Die *Munk*sche gewichtsanalytische Methode war für unsere Zwecke nicht anwendbar, da in der zur Prüfung vorliegenden Flüssigkeit auch noch Albumosen, Peptone und vielleicht unter den freien Aminosäuren auch Cystin vorhanden war. Durch den Schwefelgehalt dieser Stoffe wurde die Anwendbarkeit der, wie gesonderte Versuche ergaben, an sich zuverlässigen Methode verhindert.

[1]) *Musso*, Malys Jahresber. d. Tierchem. 1887, S. 168.

In bekannter Weise stellten wir uns sodann einen geeichten Rhodankeil für das *Authenrieth*sche Kolorimeter her und verglichen damit das rhodanidhaltige, konzentrierte Milchserum, indem 10 ccm dieses Serums (zehnfache Konzentration gegenüber Ausgangsmilch) mit 0,5 ccm n/10 HCl und der vorgeschriebenen Ferrichloridlösung versetzt wurden. Durch die Zugabe der Salzsäure wird die Bildung einer Rotfärbung durch Essigsäure und durch den Serumfarbstoff verhindert.

In fünf verschiedenen Milchproben erhielten wir so Werte von 9 bis 13 mg Rhodanwasserstoffsäure in 1 Liter frischer Milch (Kuhmilch). Bei einem Schätzungswert von 10 mg/1 Liter würde dies einen Zuwachs zu dem bekannten Anteil des Reststickstoffs der Milch in der Höhe von 0,25 mg Stickstoff in 100 ccm (= 0,2 mg/Proz.) bedeuten, ein Wert, der nicht ins Gewicht fällt.

Zusammenfassung.

1. Der durch Hitze nicht koagulierbare Anteil an Stickstoffbestandteilen der Milch (Kuhmilch) ist erheblich.

2. Durch geeignete Methoden läßt sich der Anteil von typischen Reststickstoffkörpern an den nicht hitzekoagulierbaren Stickstoffbestandteilen mit befriedigender Genauigkeit bestimmen. Die Milch enthält als normale, konstante Bestandteile: Purinbasen, Harnsäure, Harnstoff, Ammoniak, freie Aminosäuren, Kreatin und Kreatinin. Albumosen und Peptone sind ebenfalls aller Wahrscheinlichkeit nach normale, präformierte Bestandteile der Milch. Eine Notwendigkeit, besondere Benennungen für den Albumosen- bzw. Peptonanteil (Caseosen usw. des früheren Schrifttums) zu führen, besteht nicht, vielmehr kann die Einteilung der N-Bestandteile der Milch sehr einfach und übersichtlich gestaltet werden.

Durch vollständig durchgeführte Aufteilung des Stickstoffs der Milch konnte ein klares Bild über die Stickstoffbestandteile der Milch gegeben werden.

3. Frühere Bearbeitungen des sogenannten „Lactochroms", des von dem lipoidlöslichen Milchfettfarbstoff wohl unterscheidbaren, wasserlöslichen Milchfarbstoffs, konnten nicht bestätigt werden (Arbeiten von *Blyth* und *Desmoulière* und *Gautrelet*).

Es werden Methoden angegeben, mit deren Hilfe es gelingt, das genuine Lactochrom, frei von Laboratoriumsprodukten, aus der Milch zu gewinnen und zu reinigen. Der so hergestellte wasserlösliche, gelbgrüne Farbstoff der Milch ist aller Wahrscheinlichkeit nach ein Phenylalaninabkömmling, der in enger Beziehung zum Urochromogen und Urochrom steht, in systematischer Hinsicht zu der Alloxyproteinsäurefraktion gerechnet werden kann, jedoch vorläufig noch von dem

typischen Urochromogen bzw. Urochrom unterschieden werden muß. Mit Urobilin hat das Lactochrom nichts zu tun; es ist ein normaler und konstanter Bestandteil und in seinem Mengenverhältnis zur Milch keinen großen Schwankungen unterworfen. Das Lactochrom steht mit dem Eiweißstoffwechsel in enger Beziehung und gehört analytisch zu der Gruppe der „Peptone".

4. Infolge Ausarbeitung von wirksamen Isolierungsmethoden für Lactochrom kann eine weitere Untersuchung mit guter Aussicht in Angriff genommen werden.

5. Rhodanide gehören ebenfalls zu den normalen und konstanten Stickstoffbestandteilen der Milch; die Menge ist jedoch eine sehr kleine und fällt nur unwesentlich bei der Aufteilung des Stickstoffs der Milch ins Gewicht.

Über den Nachweis von Chlorophyllabbauprodukten im Urin.

Von

Martha Hofstetter (Bern).

(Aus dem medizinisch-chemischen und pharmakologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1924.)

Schon vor langer Zeit ist gelegentlich nach dem Genuß von rohem Fleisch, vor allem aber von grünen Gemüsen das Auftreten eines roten, häufig wird gesagt rot fluoreszierenden Körpers im Urin beobachtet worden. Die meisten Autoren hielten diesen Körper für Hämatoporphyrin. Einen ähnlichen roten Stoff trifft man auch bei Vergiftungen mit Substanzen der Sulfonalgruppe, die bekanntlich eine ungünstige Wirkung auf die Blutfarbstoffe ausüben können. Schließlich ist zu erwähnen, daß er bei lange dauernden Sonnenbestrahlungen ebenfalls gelegentlich im Urin nachweisbar ist. Über die chemische Beschaffenheit dieses oder, besser gesagt, dieser Farbstoffe orientieren am besten die Arbeiten von *H. Fischer* (s. das Literaturverzeichnis). Er schlägt vor, nicht mehr von Hämatoporphyrinurie, sondern von Porphyrinurie zu sprechen, da es sich offenbar um eine Anzahl miteinander chemisch und spektroskopisch verwandter Pyrrolfarbstoffe handelt. Ob die nach Chlorophylleinfuhr erscheinenden Farbstoffe mit den nach Sulfonalvergiftung auftretenden identisch sind, steht dahin, darf aber wohl mit einiger Wahrscheinlichkeit verneint werden.

Auf eine Anregung von Herrn Prof. *Bürgi* habe ich nun untersucht: nach welchen Chlorophyllgaben solche Porphyrine im Urin erscheinen. Ich habe außerdem untersucht, ob die nach Sulfonal und Trionaldarreichung oder nach Sonnenbestrahlung auftretenden Farbstoffe mit den anderen übereinstimmen.

Ich gebe zunächst eine Übersicht über die Methoden, die zur Anwendung kamen.

Methoden zum Nachweis des Hämatoporphyrins bzw. der Porphyrine im Urin.

1. Nach *Salkowski*. Zu 30 bis 50 ccm Urin setzt man alkalische Chlorbariumlösung bis zur völligen Fällung. Filtrieren. Das Filtrat wird ausgewaschen mit Aqua dest., hernach mit Alkohol absolut. Die Extraktion des Hämatoporphyrins geschieht mittels Behandlung des Filtrats mit salzsäurehaltigem Alkohol, gleich einem erwärmten Gemisch von 10 ccm Alkohol und 6 bis 8 Teilen konzentrierter Salzsäure. Die abfiltrierende Lösung ist rotviolett und gibt spektroskopisch die zwei Hämatoporphyrinstreifen.

Übersättigt man mit Ammoniak, wird die Flüssigkeit gelblich, und spektroskopisch erhält man die bekannten Streifen.

2. *Verfahren Garrod*. Urin, $^1/_5$ Volumen einer 10proz. Natronlauge. Filtration. Auswaschen des Niederschlages mit Aqua dest., hernach mit Alkohol. Zum ausgewaschenen Niederschlag eine Mischung von konzentrierter Salzsäure mit Alkohol.

Einige Zeit stehenlassen; dann Erwärmen des Gemisches im Wasserbade. Spektroskopische Untersuchung. Statt konzentrierter Salzsäure kann man auch nicht konzentrierte Schwefelsäure nehmen.

Um mit dieser Methode einen Niederschlag zu erhalten, muß der Urin phosphathaltig sein. Bei nicht phosphathaltigem Urin erzielt man einen Niederschlag durch Zusatz von Bleiacetat oder Barytmischung.

3. *Reaktion*. $^1/_5$ Volumen einer 10proz. Natronlauge zum Urin. Filtrieren. Den Niederschlag auswaschen, in Essigsäure lösen, filtrieren und das Filtrat mit Chloroform ausschütteln. Rote Chloroformlösung wenn hämatoporphyrinhaltig. Sind zu wenig Phosphate im Urin vorhanden, gibt man Calciumphosphat in essigsaurer Lösung zu.

4. 100 ccm Urin mit 5 ccm Eisessig angesäuert. Nach 48stündigem Stehen scheidet sich das Hämatoporphyrin als Niederschlag aus.

5. Saurer Urin wird mit Bleiacetat gefällt, filtriert, der Niederschlag ausgewaschen mit Aqua dest. und Alkohol. Darauf Salzsäure und Alkohol zugegeben. Wasserbad. Spektroskopischer Nachweis des Hämatoporphyrins. Zur besseren Konzentration des Farbstoffs Chloroformauszug der fertigen Reaktion.

Bei meinen Versuchsreihen zum Nachweis des Hämatoporphyrins bzw. der Porphyrine benutzte ich alle die angegebenen Methoden, vorwiegend aber Reaktion 5.

In erster Linie habe ich nun eine Anzahl Kaninchen mit Sulfonal behandelt und ihnen dann auch etwas Chlorophyll in Form eines Rohchlorophylls gegeben, dessen Gehalt an reinem Blattgrün 20 bis 30 Proz. beträgt.

1. Sulfonal-Versuchsreihe.
Kaninchen 1900 g.

1. III.	Sulfonal	0,5	Pb-Probe negativ
2. III.	„	0,5	
3. III.	„	0,5	Pb-Probe negativ
4. III.	„	0,5	
5. III.	Chlorophyll	0,2	*Salkowski* negativ
7. III.	„	0,2	
8. III.	„	0,2	
8. III.	Kaninchen exitus ...		

Nach Verabreichung von 2,0 g Sulfonal und 0,6 g Chlorophyll = **0,15** g Reinchlorophyll, das der gewöhnlichen Nahrung zugesetzt wurde, blieben die Proben negativ. In der abfiltrierten Flüssigkeit war weder der rot oder rotviolett aufleuchtende Farbstoff noch ein charakteristisches Spektrum nachweisbar.

In meinen folgenden Versuchsreihen habe ich das Aufleuchten des roten oder rotvioletten Farbstoffs mit fluoreszierend bezeichnet.

2. Sulfonal-Versuchsreihe.
Kaninchen 2100 g.

23. III.	Sulfonal	0,75	Pb-Probe negativ
24. III.	„	0,75	Filtrat gelb
28. III.	„	0,5	*Salkowski* negativ
29. III.	„	0,5	Nachprobe negativ
30. III.	„	0,5	Filtrat gelb
31. III.	„ 0,5 u. Chloroph.	0,2	Pb-Probe leichte Fluoreszenz
1. IV.	„ 0,5 u. „	0,2	Auszug mit Chloroform?
3. IV.	„ 0,5 u. „	0,2	Braunrötliches Filtrat, Fluoreszenz angedeutet
4. IV.	„	0,2	
16. IV.	Chlorophyllverfütterung	0,2	Auftreten einer deutlich nachweisbaren Fluoreszenz, sowohl nach *Salkowski* wie der Pb-Probe
17. IV.	„	0,2	
18. IV.	„	0,2	
19. IV.	Chlorophyll	0,2	Nachprobe negativ
20. IV.	„	0,2	

Vom 21. bis 30. April wurde das Kaninchen täglich mit etwa 0,2 g Chlorophyll gefüttert. In der abfiltrierten Flüssigkeit trat nach und nach eine rötliche Färbung auf, in der Fluoreszenz vorhanden war. Kein Spektrum *Salkowski* und Pb-Probe.

1., 2., 3. V.	Kein Urin		
4. V.	Chlorophyll ...	etwa 0,2	Filtrat rot, schwache Fluoreszens
5. V.	„ ...	„ 0,2	
7. V.	Kein Urin		
8. V.	Chlorophyll ...	etwa 0,2	Filtrat bräunlichrot, ziemlich starke Fluoreszenz
9. V.	„ ...	„ 0,2	
11. V.	„ ...	„ 0,2	Nur angedeutete Fluoreszenz. Pb-Probe
12. V.	„ ...	„ 0,2	
14. V.	„ ...	„ 0,2	Spur
15. V.	„ ...	„ 0,2	
18. V.	„ ...	„ 0,2	Starke rote Fluoreszenz, Filtrat rötlichbraun. Pb-Probe

19.–22. V.	Kein Urin		
23. V.	Chlorophyll . . .	etwa 0,2	Filtrat rot, starke rotviolette Fluoreszenz, Pb-Probe
24. V.	„ . . .	„ 0,2	
25. V.	„ . . .	„ 0,2	Filtrat weinrot, starke rotviolette Fluoreszenz, Pb-Probe
26. V.	„ . . .	„ 0,2	
27. V.	„ . . .	„ 0,2	
28. V.	„ . . .	„ 0,2	Dasselbe Ergebnis, Pb-Probe
29. V.	„ . . .	„ 0,2	
30. V.	„ . . .	„ 0,2	*Salkowski*, schwache Fluoreszenz, auch nach Wasserbad schwache Fluoreszenz
31. V.	„ . . .	„ 0,2	
1. VI.	„ . . .	„ 0,2	

Nach Verfütterung von 2,5 g Sulfonal konnte im Urin weder Fluoreszenz noch Hämatoporphyrinspektrum nachgewiesen werden. Die Proben fielen ganz negativ aus. Das Filtrat war gelb. Nach weiterem Verfüttern von 1,5 g Sulfonal und 0,8 g Chlorophyll trat schwache Fluoreszenz auf.

Mit fortschreitender Chlorophyllverfütterung und Sistierung des Sulfonals wurde der Farbstoff immer deutlicher und stärker rotviolett. Hand in Hand änderte sich auch die Farbe der Proben, indem sie sich von gelb zu bräunlichrot bis schließlich weinrot umwandelte. Ein Porphyrinspektrum konnte nicht nachgewiesen werden.

3. *Sulfonal-Versuchsreihe.*

Kaninchen 2700 g.

2. VI.	Sulfonal	0,75	Pb-Probe und *Salkowski* negativ
4. VI.	„	0,75	Filtrat gelb
5. VI.	„	0,75	
6. VI.	„	0,75	Pb-Probe negativ, Filtrat gelb. Kaninchen 2500 g
7. VI.	„	0,75	
8. VI.	„	1,0	Pb-Probe negativ. Filtrat gelb
9. VI.	„	1,0	
10. VI.	„	1,0	
11. VI.	„	0,75	Pb-Probe negativ, Filtrat gelblich mit schwachrötlichem Ton
12. VI.	„	—	
13. VI.	„	0,75	Pb-Probe, leichte Fluoreszenz. Kaninchen 2200 g
14. VI.	„	0,75	
15. VI.	„	0,75	Pb-Probe, Fluoreszenz schwach, doch etwas stärker als vorige Probe
16. VI.	„	—	
17. VI.	„	—	
18. VI.	„	1,0	Pb-Probe
19. VI.	„	1,0	Anflug von Spektrum
21. VI.	„	1,0	Fluoreszenz schwach, Filtrat bräunlichrot. Pb-Probe. Kein Spektrum
22. VI.	„	1,0	
23. VI.	„	0,75	
24. VI.	„	0,75	Pb-Probe, Filtrat braungelb, Fluoreszenz schwach, kein Spektrum
25. VI.	„	—	
26. VI.	„	0,75	
27. VI.	„	0,75	
28. VI.	„	0,75	Pb-Probe, Filtrat braungelb, Fluoreszenz schwach, kein Spektrum
29. VI.	„	—	
30. VI.	„	0,75	

Da in dem Urin dieses mit 17,5 g Sulfonal behandelten Kaninchens nie ein Hämatoporphyrinspektrum auftrat, setzte ich zu 100 ccm Urin 5 ccm Hämatoporphyrin und fand dabei mit nachfolgenden Verdünnungen immer ein deutlich positives Hämatoporphyrinspektrum.

Von den 100 ccm Urin und 5 ccm Hämatoporphyrin nahm ich:

5 : 55	Aqua	Spektrum	positiv	
5 : 100	"	"	"	
5 : 150	"	"	"	
5 : 200	"	"	"	
5 : 250	"	"	"	
5 : 300	"	"	"	
5 : 400	"	"	"	
5 : 500	"	"	"	
5 : 600	"	"	"	
5 : 700	"	"	"	Nach *Salkowski, Garrod*: mit Pb-Probe und mit der Eisessigprobe

Den bis jetzt mit Sulfonal gefütterten Kaninchen gab ich nun die folgenden Wochen Chlorophyll.

3. VII.	Chlorophyll . . .	etwa 0,2	Filtrat dunkelgelb, Fluoreszenz schwach. Pb-Probe
4. VII.	" . . .	" 0,2	
5. VII.	" . . .	" 0,2	
6. VII.	" . . .	" 0,2	
7. VII.	" . . .	" 0,2	Filtrat rötlich, Fluoreszenz schwach rötlich. Spektrum. Keine Pb-Probe
9. VII.	" . . .	" 0,2	
10. VII.	" . . .	" 0,2	
11. VII.	" . . .	" 0,2	Filtrat: der rötliche Ton verstärkt, ebenso die Fluoreszenz. Pb-Probe
12. VII.	" . . .	" 0,2	
13. VII.	" . . .	" 0,2	
14. VII.	" . . .	" 0,2	
16. VII.	" . . .	" 0,2	Filtrat rot, Fluoreszenz stark rot. Pb-Probe. Kaninchen 2800 g
17. VII.	" . . .	" 0,2	
18. VII.	" . . .	" 0,2	
19. VII.	" . . .	" 0,2	
20. VII.	" . . .	" 0,4	Filtrat dunkelrot, Fluoreszenz rotviolett. Pb-Probe, kein Spektrum
21. VII.	" . . .	" 0,4	
23. VII.	" . . .	" 0,4	
24. VII.	" . . .	" 0,4	Filtrat rotschwarz, Fluoreszenz rotviolett. Pb-Probe
25. VII.	" . . .	" 0,4	
26. VII.	" . . .	" 0,4	
27. VII.	" . . .	" 0,4	Filtrat rotschwarz, starke rotviolette Fluoreszenz
28. VII.	" . . .	" 0,4	

Nach Verfütterung von 7,5 g Sulfonal zeigte sich im Filtrat leichte Fluoreszenz; nach weiterem Sulfonalgebrauch, im ganzen wurden 17,5 g verfüttert, trat einmal ein Anflug von Spektrum auf, jedoch nie die charakteristischen Spektralstreifen. Schon bei 3,2 g Chlorophyll, tägliche Dosis etwa 0,2 g, wurde der rot aufleuchtende Farbstoff deutlich nachweisbar, und das Filtrat ging von der dunkelgelben zur roten Farbe über, die nach weiterer Chlorophyllverfütterung von 3,6 g dunkel rotschwarz wurde und starkes violettrotes Aufleuchten zeigte. Ein Spektrum war nie nachweisbar.

4. Versuchsreihe Trional. Kaninchen 2900 g.

30. VII.	Trional	0,5	Probe mit Eisessig negativ
31. VII.	"	0,5	
1. VIII.	"	0,5	Pb-Probe negativ. Keine Fluoreszenz
2. VIII.	"	0,5	
3. VIII.	"	0,75	
4. VIII.	"	0,75	
7. VIII.	"	0,75	Filtrat rot, Fluoreszenz stark. Pb-Probe. Kaninchen 2700 g
8. VIII.	"	1,0	
9. VIII.	"	1,0	
11. VIII.	"	0,75	Filtrat weinrot, Fluoreszenz stark. Pb-Probe. Kaninchen 2650 g
12. VIII.	"	—	
13. VIII.	"	0,75	
14. VIII.	"	0,75	
15. VIII.	"	0,75	Filtrat rotbraun, Fluoreszenz mit rotviolettem Ton. Pb-Probe
16. VIII.	"	—	
17. VIII.	"	—	
18. VIII.	"	1,0	Filtrat rotbraun. Fluoreszenz rotviolett Anflug von Spektrum. Pb-Probe
19. VIII.	"	1,0	
20. VIII.	"	0,75	
22. VIII.	Chlorophyll	0,2	Filtrat dunkler rot, als bis jetzt mit Trional. Anflug von Spektrum. Pb-Probe
23. VIII.	"	0,2	
24. VIII.	"	0,2	
25. VIII.	"	0,2	
27. VIII.	"	0,2	Filtrat ganz dunkelrot. Fluoreszenz rotviolett. Pb-Probe
28. VIII.	"	0,2	
29. VIII.	"	0,2	
30. VIII.	"	0,2	Dasselbe Resultat
31. VIII.	"	0,2	
2. IX.	"	0,2	Filtrat weinrot. Floureszenz rotviolett. Pb-Probe
3. IX.	"	0,2	
4. IX.	"	0,2	Filtrat weinrot. Fluoreszenz rotviolett. Pb-Probe. Kaninchen 2500 g
5. IX.	"	0,2	
6. IX.	"	0,2	
7. IX.	"	0,2	Filtrat weinrot. Fluoreszenz rotviolett. Pb-Probe
8. IX.	"	0,2	
9. IX.	"	0,2	Pb-Probe. Filtrat weinrot, Fluoreszenz rotviolett
10. IX.	"	0,2	
11. IX.	"	0,2	
12. IX.	"	0,2	Filtrat dunkelrot, starke Fluoreszenz, kein Spektrum. Kaninchen 2600 g
13. IX.	"	0,2	
14. IX.	"	0,2	
15. IX.	"	0,2	
17. IX.	"	0,2	Filtrat rot, etwas heller als bei den vorigen Proben, Fluoreszenz rotviolett. Pb-Probe
18. IX.	"	0,2	
19. IX.	"	0,2	
20. IX.	"	0,2	
22. IX.	"	0,4	Filtrat wieder dunkelrot, Fluoreszenz rotviolett, kein Spektrum
23. IX.	"	0,4	
24. IX.	"	0,4	
25. IX.	"	0,4	Filtrat dunkelrot. Fluoreszenz rotviolett. Pb-Probe. Kaninchen 2680 g
26. IX.	"	0,4	
27. IX.	"	0,4	
28. IX.	"	0,4	

Trional-Versuchsreihe.

Die zwei ersten Proben fielen negativ aus, dann trat starke Fluoreszenz und weinrote Farbe des Filtrats auf. Einmal Anflug von Spektrum. Nach Chlorophyll trat deutlich ein intensiveres Rot des Filtrats auf und die Fluoreszenz war noch stärker, mit ausgesprochenem, rotviolettem Ton. Auch hier einmal Anflug von Spektrum? Die Farbe des Filtrats schwankte in der letzten Zeit etwas, immer aber war der rote Ton vorhanden.

Größere Mengen Sulfonal oder Trional als die von mir bei diesen Versuchen verwendeten werden von den Tieren niemals vertragen. Sie gingen nach kurzer Zeit ein.

Versuchsreihe mit Chlorophyll.
Kaninchen 2500 g.

26. VI.	—	—	Pb-Probe. Filtrat gelb, keine Fluoreszenz
27. VI.	—	—	
28. VI.	—	—	Dasselbe Resultat
29. VI.	—	—	
30. VI.	Chlorophyll	0,4	Filtrat weinrot, Fluoreszenz stark. Pb-Probe
1. VII.	„	0,4	
2. VII.	„	0,5	
3. VII.	„	0,5	
4. VII.	„	0,5	Filtrat weinrot Fluoreszenz rotviolett, kein Spektrum. Pb-Probe. Kaninchen 2700 g
5. VII.	„	0,5	
6. VII.	„	0,5	

Die zwei ersten Proben waren negativ, weder Fluoreszenz noch Spektrum vorhanden, Filtrat gelb. Schon 2 Tage nach Chlorophyllfütterung trat rotviolette Fluoreszenz auf und damit zugleich die weinrote Farbe des Filtrats. Kein Spektrum.

Versuchsreihe mit reiner Grasfütterung.
Kaninchen 2650 g.

10. VII.	—	—	Filtrat rot, Fluoreszenz deutlich. Pb-Probe
11. VII.	—	—	
12. VII.	—	—	
13. VII.	Chlorophyll	0,4	Filtrat rot, Fluoreszenz rotviolett. Pb-Probe
14. VII.	„	0,4	
15. VII.	„	0,5	
18. VII.	„	0,5	Filtrat dunkelrot, starke rotviolette Fluoreszenz, Anflug von Spektrum. Pb-Probe
19. VII.	„	0,5	
20. VII.	„	0,5	
21. VII.	„	0,5	
22. VII.	„	0,4	Filtrat dunkelrot. Fluoreszenz rotviolett, kein Spektrum. Pb-Probe
23. VII.	„	0,4	
24. VII.	„	0,4	
26. VII.	„	0,5	Filtrat dunkelrot, starke rotviolette Fluoreszenz
27. VII.	„	0,5	
28. VII.	„	0,4	Filtrat dunkelrot, Fluoreszenz rotviolett
29. VII.	„	0,4	

Bei diesem Kaninchen, das den ganzen Sommer ausschließlich Grasfütterung hatte, ergab schon die erste Probe Fluoreszenz und rotes Filtrat.

Nach Chlorophyllverfütterung trat deutlich verstärkte, rotviolette Fluoreszenz auf. Die Farbe des Filtrats war dunkelrot, röter als bei Grasfütterung. Einmal Anflug von Spektrum.

Chlorosanversuche an Menschen.

28. Mai. Urinuntersuchung von bis jetzt nicht mit Chlorosan behandelten Menschen.

Erste Probe nach *Salkowski* und Pb-Probe fielen negativ aus. Das Filtrat war von heller rosa Farbe mit leicht violettem Ton. Weder Fluoreszenz noch Spektrum nachweisbar.

Seit dem 29. Mai regelmäßiger Gebrauch von sechs bis acht Chlorosantabletten täglich.

10. Juni. Pb-Probe: Filtrat rot, starke Fluoreszenz. Ausschütteln mit Chloroform ergab rosa Fluoreszenz.
12. Juni. Farbe weinrot, starke rotviolette Fluoreszenz.
13. Juni. Pb-Probe. Filtrat dunkelrot, rotviolette Fluoreszenz. Anflug von Spektrum.
18. Juni. Pb-Probe. Filtrat dunkelrot, rotviolette Fluoreszenz. Kein Spektrum.
22. Juni. Pb-Probe. Filtrat dunkelrot, Fluoreszenz rotviolett.
28. Juni. Pb-Probe. Filtrat dunkelrot, Fluoreszenz rotviolett.
30. Juni. Pb-Probe. Filtrat dunkelrot, Fluoreszenz rotviolett.

Die ersten Proben ohne Chlorosan fielen negativ aus. Das Filtrat war von heller Amethystfarbe ohne jegliche Fluoreszenz. Nach Gebrauch von Chlorosan nahm das Filtrat allmählich dunkelrote Farbe an; in dem Maße verstärkte sich auch die Fluoreszenz. Rosa Fluoreszenz beim Ausschütteln mit Chloroform. Einmal Anflug von Spektrum, jedoch war die Identifizierung mit den Hämatoporphyrinstreifen nicht möglich. Ein weiterer Versuch an einem anderen Patienten ergab das gleiche. Der Farbstoff war vom dritten Versuchstage an nachweisbar.

Versuche nach Sonnenbestrahlung.

Auf Wunsch von Herrn Prof. *Jadassohn*, der mir mitteilte, daß auch nach Sonnenbestrahlung Hämatoporphyrin (Porphyrine ?) im Urin auftreten solle, habe ich an drei Schulkindern unter Kontrolle des Badelehrers einige Versuche gemacht. Dauer des täglichen Sonnenbades je 1 Stunde.

1. Versuch. Bei einem Knaben, der vor den Versuchen ab und zu gesonnt hatte.

21. Mai. Kaum nachweisbare Fluoreszenz (wenig Sonne).
23. „ Fluoreszenz stark. Filtrat Amethystfarbe.
28. „ Fluoreszenz schwach. Filtrat hellviolett (wenig Sonne).
2. Juni. Fluoreszenz stark. Filtrat rotviolett.
5. „ Fluoreszenz stark. Filtrat weinrot.
9. „ Fluoreszenz schwächer als am 5. Juni. Filtrat weinrot.
14. „ Fluoreszenz wie am 9. Juni. Filtrat braunrötlich.
16. „ Fluoreszenz stark. Filtrat rot.
19. „ Fluoreszenz stark. Filtrat rot.

2. Versuch. Normaler Urin ohne vorherige Sonnenbäder.

29. Mai. Drei Reaktionen nach *Garrod*, *Salkowski* und mit der Bleizuckerfällung ergaben blaßviolette Farbe des Filtrats, aber keine Fluoreszenz.

2. Juni. Erstes Sonnenbad: Filtrat rotviolett. Leichte Fluoreszenz, kein Spektrum.
4. „ Zweites Sonnenbad: Filtrat weinrot. Fluoreszenz sehr stark.
5. „ Drittes Sonnenbad: Filtrat weinrot. Fluoreszenz sehr stark.

3. Versuch. Nie vorher Sonnenbad.
6. Juli. Filtrat braunrot. Fluoreszenz schwach.
11. „ Filtrat hellrot. Fluoreszenz stärker.
16. „ Filtrat rot. Fluoreszenz ziemlich stark.
22. „ Filtrat dunkelrotschwarz. Fluoreszenz sehr stark.

Nach den kurzen Versuchen scheint es, daß der rot oder rotviolett aufleuchtende Farbstoff im normalen Urin hier und da, vielleicht wegen Einnahme chlorophyllhaltiger Speisen, in Spuren vorkommt; daß er hingegen mit systematischer Sonnenbestrahlung um so rascher und deutlicher nachweisbar ist, je intensiver die Bestrahlung ist.

Aus diesen Versuchen, die nur als Einleitung zu weiteren Forschungen zu betrachten sind, ergibt sich in erster Linie, daß bei Dosen von 0,5 bis 0,75 g Sulfonal, die Kaninchen gegeben wurden, nur eine spärliche Menge des früher erwähnten roten Farbstoffs im Urin auftritt. Eine sichere Identifizierung dieses Körpers mit Hämatoporphyrin war nicht möglich.

Ähnliches gilt vom Trional, das in Dosen von 0,5 bis 1,0 g täglich wochenlang verabreicht wurde. Doch war die Reaktion hier stärker. Nach Chlorophylldarreichung trat der rote oder, sagen wir besser, ein roter Farbstoff ziemlich rasch im Urin auf. Einmalige Dosen von 0,4 g Rohchlorophyll genügten, um ihn auftreten zu lassen. Die Reaktion war immer viel deutlicher als bei Verwendung von Sulfonal oder Trional. Ein sicherer Nachweis, daß es sich um Hämatoporphyrin handelt, gelang nie. Hier und da war ein Anflug des Spektrums zu bemerken, aber niemals so deutlich, daß wir eine Täuschung hätten ausschließen können. Bei Verwendung von Urinen, denen Hämatoporphyrin zugesetzt worden war, konnte das Spektrum dagegen stets klar erkannt werden, selbst bei weitgehender Verdünnung. Der gleiche rote Farbstoff ist im Kaninchenharn immer vorhanden, wenn die Tiere Gras fressen, doch kann man die Reaktion durch Eingabe von extrahiertem Chlorophyll so erheblich verstärken, daß man den Eindruck gewinnt, das aus den Cellulosewänden befreite Blattgrün werde ungleich besser resorbiert.

In einer weiteren Versuchsreihe gab ich Patienten Chlorosanpastillen. Der Farbstoff trat nach täglicher Einfuhr von sechs bis acht Tabletten deutlich nachweisbar im Urin auf. Auch hier war einmal ein Anflug von Spektrum vorhanden, jedoch zu unsicher, um bestimmte Schlüsse ziehen zu können.

Aus diesen Untersuchungen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Sowohl bei chronischen Sulfonal- und Trionalvergiftungen als auch bei Chlorophylleingabe per os treten beim Kaninchen Porphyrine

in kleiner Menge in den Urin. Ein deutlicher spektroskopischer Nachweis konnte in keinem Falle geleistet werden, doch war das chemische Verhalten der gefundenen Farbstoffe charakteristisch.

Bei Chlorophylleinfuhr per os (in Dosen von 0,2 bis 0,4 g Rohchlorophyll mit einem Reinchlorophyllgehalt von etwa 0,01 bis 0,02 g gegeben) war die Porphyrinausscheidung beträchtlicher als bei Sulfonal- bzw. Trionalgabe. Wahrscheinlich werden bei Chlorophylleinnahme andere Porphyrine ausgeschieden als bei den genannten Vergiftungen. Dies geht unter anderem aus den abweichenden Farbennuancen hervor.

Kaninchen scheiden den Farbstoff auch aus, wenn sie mit frischem grünen Gras gefüttert werden. Er ist dann regelmäßig im Urin zu finden. Eine Beigabe von extrahiertem Chlorophyll zu der Nahrung in der oben genannten Menge genügt aber, um die Reaktion ganz beträchtlich zu verstärken, woraus zu schließen ist, daß das aus den Cellulosewänden befreite Blattgrün viel besser resorbiert wird; denn eigentlich war die in solcher Form gegebene Chlorophyllmenge gegenüber der im Grasfutter enthaltenen minimal.

Wenn ich einem Patienten Chlorophyll in Form des Chlorosan-*Bürgi* gab, so trat der Farbstoff nach Einnahme von sechs bis acht Pastillen pro Tag in den Urin über. Nimmt man den Gehalt einer Pastille an Reinchlorophyll zu 1 bis 2 mg an, so folgt daraus, daß der Farbstoff bei Einnahme von 6 bis 16 mg pro die nach etwa 3 Tagen schon im Urin nachweisbar ist.

Bei Sonnenbestrahlungen erscheinen ebenfalls regelmäßig Porphyrine im Urin.

Literatur.

1) *Hopkins*, Jahresber. f. Tierchem. **25**, 250. — 2) *Stokvis*, ebendaselbst **29**, 841. — 3) *O. Schumm*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**, 123, **1916**. — 4) *Derselbe*, Hamburger Ärzte-Korrespondenz Nr. 28, 9. Juli 1916. — 5) *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**, 32, 1916. — 6) *Derselbe*, ebendaselbst **80**, 1, 1912. — 7) *Derselbe*, ebendaselbst **90**, 12, 1914. — 8) *Derselbe*, Mitt. a. d. Hamburger Staats-Krankenanstalten **12**, H. 9, S. 197, 1911. — 9) *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **96**, 183, 1915. — 10) *Derselbe*, ebendaselbst **98**, 65, 1916. — 11) *H. Fischer*, ebendaselbst **97**, 148, 1916. — 12) *Derselbe*, Münch. med. Wochenschr. 1916, S. 377. — 13) *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **95**, 37, 1915. — 14) *Derselbe*, ebendaselbst **87**, 109, 1916. — 15) *H. Günther*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **105**, 89, 1911. — 16) *C. Hegler*, *Eug. Fränkel* und *O. Schumm*, Deutsch. med. Wochenschr. 1913, Nr. 18. — 17) *A. Malaski* und *Marklewsky*, diese Zeitschr. **34**, 319, 1910. — 18) *L. Marchlewsky*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**, 33, 1914. — 19) *A. Ellinger* und *O. Risser*, Z. **98**, 1, 1916.

Über das Auftreten eines roten Farbstoffes nach Einnahme von reinem Chlorophyll. II.

Von

Antonio Potier Godinho (Lissabon).

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1924.)

Seit langem ist bekannt, daß im menschlichen Urin von Zeit zu Zeit ein rötlicher Farbstoff auftritt, der von dem Genuß von rohem Fleisch oder von grünen Gemüsen herrühren soll. Nach der Auffassung verschiedener Autoren, von denen wir *Hopkins* (1) und *Stokwis* (2) hervorheben wollen, handelt es sich dabei um die Ausscheidung von Hämatoporphyrin, also um das eisenfreie Hämoglobinderivat, das auch bei verschiedenen Erkrankungen und bei Sulfonal-, Trional- und Tetronalvergiftungen im Urin zu finden ist. Demgegenüber betonte aber schon *Nencki* anläßlich des Referats über die *Stokwis*sche Arbeit in den Jahresberichten für Tierchemie, daß *Stokwis* die Unterschiede zwischen Phylloporphyrin (von *Marchlewski* entdeckt) und Hämatoporphyrin offenbar unbekannt seien. Wir werden übrigens sehen, daß es weder Fräulein *Hofstetter*, die zuerst über diese Frage auf dem medizinisch-chemischen Institut Berns arbeitete, noch mir jemals gelungen ist, den erwähnten roten und leicht fluoreszierenden Körper als Hämatoporphyrin spektroskopisch oder chemisch zu identifizieren. Wahrscheinlich handelt es sich aber auch nicht um Phylloporphyrin, das dasselbe Spektrum hat wie das Hämatoporphyrin, sondern um ein nicht weiter zu charakterisierendes Porphyrin.

Die chemischen Reaktionen sind übrigens, wie *Fischer* mit Recht hervorhebt, sicherer als die spektroskopische. *Bürgi* konnte nun feststellen, daß der genannte rote Farbstoff regelmäßig im Urin erscheint, wenn man dem Organismus ein chlorophyllhaltiges Präparat einverleibt. Auf seine Veranlassung hat dann Fräulein *Hofstetter* diese Eigentümlichkeit genau untersucht. An einer Reihe von Patienten konstatierte sie, daß die Reaktion auf diesen Farbstoff beinahe immer positiv ausfällt, wenn man ihnen dreimal drei bis dreimal vier Chlorosan-

tabletten gibt. Sie suchte, wie erwähnt, den Farbstoff mit Hämatoporphyrin zu identifizieren, es gelang ihr aber niemals, die für das letztere charakteristischen spektralen Absorptionsstreifen zu finden. Suchte sie den Farbstoff zu konzentrieren, so verdunkelte sich das Gesichtsfeld, die Streifen traten indessen nicht auf.

Allerdings verfügte sie nicht über Spektralapparate von besonders feiner Konstruktion, doch schienen die angewendeten Instrumente zweckmäßig genug, um die gestellte Frage zu beantworten. Ich suchte nun auf eine Anregung von Prof. *Bürgi*, die Ausscheidung des roten Farbstoffs weiter zu ergründen, indem ich meinen Versuchspersonen, vornehmlich mir selber, an Stelle von Chlorosan, das neben Chlorophyll noch andere Substanzen enthält, ein reines Chlorophyllprodukt einführte.

Das medizinisch-chemische Institut verfügte über ein größeres Quantum von reinem *Phäophytin*, das als reines, aber magnesiumfreies Chlorophyll zu betrachten ist.

Nach den bisher vorgenommenen Versuchen ließ sich nämlich nicht mit Sicherheit sagen, daß der rot fluoreszierende Farbstoff wirklich von Chlorophyll herstammt, denn die Untersuchungen waren niemals mit auch nur etwas gereinigtem Blattgrün, geschweige denn mit der chemisch reinen Verbindung angestellt worden. Es war also immerhin die Annahme möglich, daß es aus anderen Blattbestandteilen stamme als aus dem Chlorophyll, z. B. vielleicht aus den Carotinoiden.

Ich will gleich vorwegnehmen, daß eine solche Annahme durch meine Versuche als widerlegt gelten kann.

Wie schon erwähnt, hat Fräulein *Hofstetter* die Reaktion positiv erhalten, wenn sie ihre Patienten dreimal drei bis dreimal vier Chlorosanpastillen nehmen ließ. Der Gehalt der Pastillen an chemisch reinem und als solches nachweisbarem Chlorophyll beträgt 1,5 bis 2 mg, rechnet man die höheren Abbauprodukte dazu, so beträgt er 6 bis 10 mg[1]). Es ist aber unmöglich, zu wissen, ob der genannte Farbstoff sich nur aus reinem Chlorophyll bildet oder ob er auch von höheren Abbauprodukten dieser Substanz stammen kann.

Der Nachweis der Substanz, die übrigens als solche auch ohne chemische Reaktionen im Urin erkannt werden kann, war die folgende:

Wir verwendeten die ganze Tagesmenge des Urins. Der Urin muß sauer reagieren. Ist er also alkalisch, so muß er angesäuert werden. Es wurden der Tagesmenge je 100 ccm große Mengen entnommen. Aus diesen wurde der Farbstoff mit Bleiessig ausgefällt. An kleinen Proben wurde nachgeprüft, ob die Fällung eine vollständige war.

---

[1]) Siehe die Angabe *Bürgis*, Schweiz. Rundsch. f. Med. 1919, S. 69 und 640, und *Löfflers*, Correspondenzbl. f. Schweiz. Ärzte 1919, S. 879.

Die Niederschläge werden mehrmals mit Alkohol gewaschen, getrocknet und zusammengelegt. Dieser Rückstand wurde mit einigen Tropfen Salzsäure versetzt und hierauf mit 20 ccm 96proz. Alkohols auf dem Wasserbade so lange erwärmt, bis der Alkohol auf etwa die Hälfte seines ursprünglichen Volumens eingedampft war; hierauf wurde abfiltriert und das Filtrat untersucht. Der Farbstoff ist deutlich rot gefärbt und zeigt eine leichte, nicht näher zu charakterisierende Fluoreszenz. Die Methode entspricht mit kleineren Modifikationen der von *Salkowski* angegebenen. Die charakteristischen Hämatoporphyrinstreifen fanden wir niemals, nicht einmal eine Andeutung derselben.

Die chemischen Reaktionen auf Hämatoporphyrin, die von dem Assistenten des medizinisch-chemischen Instituts, Dr. *M. Perelstein*, auch ausgeführt wurden, waren immer negativ. Er verwendete hauptsächlich den folgenden Nachweis: Bei Behandlung der ammoniakalischen Lösung mit Alaun oder mit Calciumchlorid oder Natriumphosphatlösung wird das Hämatoporphyrin als roter Niederschlag abgeschieden, aus dem es in saurem Alkohol gelöst werden kann. Diese Reaktion ist wie alle anderen, wie erwähnt, immer negativ. Bleiessig fällt eben neben dem roten Farbstoff alles mögliche, und der voluminöse Niederschlag reißt den Farbstoff mit. Die genannte zweite Reaktion würde dagegen eine Art Aussalzungsprozeß darstellen, der mit Hämatoporphyrin geht, mit dem von uns untersuchten Farbstoff aber nicht.

Ich möchte nicht verfehlen, an dieser Stelle noch besonders zu betonen, daß wir die spektroskopischen Untersuchungen mit peinlichster Gewissenhaftigkeit vorgenommen haben. Auch sei erwähnt, daß man die rote Fluoreszenz von richtigen Hämatoporphyrinlösungen leicht nachweisen kann, wenn man Sonnenlicht oder Licht einer elektrischen Bogenlampe zunächst zur Absorption der roten Strahlen durch Kupfersulfatlösung gehen und dann erst in die zu untersuchende Flüssigkeit eintreten läßt. Auch diese Art der Untersuchung ergab immer ein negatives Resultat. Mit anderen Worten: Der von uns nach Chlorophylleingabe im Urin gefundene rötliche Farbstoff mag als Chlorophyllderivat dem Hämatoporphyrin nahestehen, ist aber kein Hämatoporphyrin.

Die Untersuchung habe ich ausnahmslos an mir selber vorgenommen. Während der ganzen Zeit enthielt ich mich des Genusses von grünen Gemüsen und von rohem Fleisch, das einen ähnlichen Stoff in den Urin zu schicken scheint.

Meine Tabellen geben wohl alles Notwendige an. Ich habe die erhaltenen Reaktionen als schwach, mittelschwach, stark und sehr stark bezeichnet.

Das Phäophytin, das chemisch rein war, nahm ich mit Milchzucker verrieben zu mir, meistens während der Mahlzeiten.

Tabelle I.

Datum	Dosis	Zeit der Urinentleerung	Reaktion
26. II.	2 × 0,1	2h nachmittags	schwach
27. II.	2 × 0,1	2 "	"
28. II.	2 × 0,1	11 vormittags	ziemlich stark
1. III.	2 × 0,1	11 "	stark
2. III.	2 × 0,1	11 "	"
3. III.	2 × 0,1	11 30′ "	"
4. III.	1 × 0,1	11 30 "	"
5. III.	—	11 "	"
6. III.	—	9 "	"
7. III.	—	—	—
8. III.	—	—	stark
9. III.	—	11 vormittags	"
10. III.	—	4 nachmittags	deutlich
11. III.	—	3 "	"
12. III.	—	3 "	Flöreeus
13. III.	—	3 "	"
14. III.	—	3 "	Spuren
17. III.	—	3 "	"
20. III.	—	3 "	"

Tabelle II.

Datum	Dosis	Urin	Reaktion
24. IV.	—	Gesammelte Tagesmenge auf 2500 ccm verdünnt	sehr leicht
25. IV.	—	—	—
26. IV.	—	Gesammelte Tagesmenge auf 2500 ccm verdünnt	stark Dl.
27. IV.	—	"	" "
28. IV.	—	"	weniger stark
29. IV.	—	"	" "
30. IV.	—	"	Spuren
1. V.	—	"	stärker

Tabelle III.

Datum	Dosis	Urin	Reaktion
28. V.	3 × 0,05	Gesammelter Tagesurin auf 2500 ccm verdünnt	Spuren
29. V.	—		kaum sichtbar
30. V.	—		stark
31. V.	—		weniger stark
1. VI.	—		stark
2. VI.	—		sehr stark
3. VI.	—		" "
4. VI.	—		stark
5. VI.	—		"
6. VI.	—		mäßige
7. VI.	—		wenig Pl.
13. VI.	—		Spuren

Tabelle IV.

Datum	Dosis	Urin	Reaktion
2. VII.	3 × 0,1	Gesammelter Tagesurin*) auf 2500 ccm verdünnt	Spuren
3. VII.	—		"
4. VII.	—		mäßiger
7. VII.	—		stark
8. VII.	—		" *)
9. VII.	—		stärker*)
10. VII.	—		" *)
11. VII.	—		sehr stark
14. VII.	—		" "
15. VII.	—		mäßiger
16. VII.	—		sichtbar

*) Diese Reaktion.

Tabelle V.

Datum	Dosis	Zeit der Urinentleerung	Reaktion
22. VII.	1 × 0,05	3h nachmittags	Leichte Fluors ohne Veränderung
23. VII.	—	10 vormittags	
24. VII.	—	10 "	
25. VII.	—	10 "	
26. VII.	—	10 "	

Besprechung der Resultate.

Tabelle I gibt die Resultate wieder, die ich bei fortgesetzter Einnahme von hohen Dosen Phäophytin erhalten habe.

Wie oben erwähnt, erhielt Fräulein *Hofstetter* die Reaktion positiv, wenn sie sich oder ihren Patienten dreimal 3 bis dreimal 4, also 9 bis 12 Chlorosanpastillen pro Tag gab. Diese entsprechen, je nach den oben gemachten verschiedenen Annahmen, d. h. je nachdem man denkt, die Reaktion werde nur von unverändertem oder wenig verändertem oder auch von abgebautem Chlorophyll gegeben, 1,35 bis 1,8 bzw. 1,8 bis 2,4 cg Reinchlorophyll bzw. 9 bis 1,2 dg Chlorophyll plus Abbauprodukte.

Die von mir erhaltenen Reaktionen waren jedenfalls stärker als die von Fräulein *Hofstetter*. Man sieht übrigens aus Tabelle I, daß die Ausscheidung auch nach dem Aussetzen des Mittels noch andauerte, und zwar mehr als 3 Wochen. Ja, sie war auch noch am 4. April (siehe Tabelle II), also nach einem Monat, nicht ganz erloschen. Die Gesamteinfuhr betrug 1,3 g Phäophytin.

Das Molekulargewicht dieses Körpers ist, da nur Mg aus der Verbindung austritt und zwei Wasserstoffatome hinzukommen, von dem des Chlorophylls so wenig verschieden, daß wir ruhig Phäophytin als Reinchlorophyll rechnen können.

Zu bemerken ist auch noch, daß die Reaktion sich schon am ersten Tage der Einnahme zeigt, und daß sie bei fortgesetzter Zufuhr an Stärke zunimmt.

Tabelle II belehrt über einen Versuch, bei dem nur drei Dosen von 0,05 Phäophytin genommen wurden. Die Reaktion, die vorher schon als Folge der ersten Einnahmen leicht positiv war, wurde rasch stärker, und dieses Stärkerwerden dauert einige Tage an.

Tabelle III gibt uns Resultate eines Versuchs wieder, der demjenigen von Versuch II analog ist. Die Reaktion war vorher, wie ich noch beizufügen habe, negativ geworden. Das Hauptresultat ist dasselbe; nach dreimal 0,05 Phäophytin stieg die Ausscheidung des roten Stoffes allmählich an, und auch nach 14 Tagen war die Färbung des Urins deutlich.

Tabelle IV. Hier wurden dreimal 0,01, also die doppelte Menge gegeben. Das Resultat war ähnlich denen von Tabellen I und II, nur war es der Höhe der Dosen entsprechend beträchtlicher.

Tabelle V. In dieser Versuchsreihe wurde ein einziges Mal 0,05 Phäophytin gegeben.

2 Tage lang trat eine rote Färbung geringen Grades im Urin auf, dann blieb sie aus.

Wir konnten nicht erwarten, mit geringeren Dosen noch einen nennenswerten Effekt zu erhalten, und ich habe damit meine Versuchsreihen abgeschlossen.

Es scheint aber nicht ohne Interesse, meine Resultate mit einem Versuch, den *C. T. v. Traczescki* im vergangenen Sommer ausgeführt hat und der, wie man auf dem medizinisch-chemischen Institut Berns gesehen hat, als typisch angesehen werden kann, zu vergleichen.

C. T. v. Traczescki nahm am 18. August 1920 400 g Spinat frisch gewogen zu sich. (Diese 400 g würden nach *W. Löffler*, der seine Vergleichszahlen den Publikationen *Willstätters* entnommen hat, etwa 500 bis 560 Chlorosanpastillen entsprechen.)

Die Resultate der Urinuntersuchungen waren die folgenden:

18. August. 11,45 Urinreaktion negativ.
(12,30 Mahlzeit von etwa 400 g Spinat.)
15,30 Urinreaktion positiv (schwach).
17,30 ,, ,, ,,
19,— ,, ,, (stark).
19. August. Mittlere Tagesreaktion (bis 3 Uhr nachmittags) sehr schwach.
20. August. Reaktion immer negativ.

Der von *Bürgi* gezogene Schluß, daß aus den grünen Gemüsen das Chlorophyll nur in ganz geringen Mengen resorbiert wird und daß das meiste infolge der Celluloseeinschlüsse unverdaut abgeht, dürfte daher wohl zu Recht bestehen.

Die Hauptresultate meiner Arbeit sind die folgenden:

1. Auch bei Einnahme von reinem Chlorophyll (in Form von Phäophytin) erscheint ein roter, leicht fluoreszierender Farbstoff im Urin.

2. Die erste Ausscheidung beobachtet man schon am Tage der Einnahme.

3. Die Ausscheidung ist auch bei Einnahme einer kleinen Dosis von 0,05 erst in einigen Tagen beendigt, bei Verwendung größerer Dosen, die auf mehrere Tage verteilt gegeben wurden, kann sie wochenlang andauern.

4. Dieser rote Farbstoff ist mit Hämatoporphyrin nicht identisch.

5. Bei Einnahme ungleich größerer Mengen Chlorophyll in Form grüner Gemüse geht infolge der Celluloseeinschlüsse nur wenig Blattgrün in Resorption, und der rote Farbstoff tritt nur während eines Tages und nur in kleiner Menge in den Urin über.

Herrn Prof. *Emil Bürgi*, der mich mit Rat und Tat bei Anfertigung dieser Arbeit stets gern unterstützt hat, möchte ich auch an dieser Stelle noch einmal meinen aufrichtigen Dank sagen.

Literatur.

1) *Hopkins*, Jahresber. f. Tierchem. **25**, 250. — 2) *Stockis*, ebendaselbst **29**, 841. — 3) *O. Schumm*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**, 123, 1916. — 4) *Derselbe*, Hamburger Ärzte-Korrespondenz, 9. Juli 1916, Nr. 28. — 5) *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**, 32, 1916. — 6) *Derselbe*, ebendaselbst **80**, 1, 1912. — 7) *Derselbe*, Festschrift des Eppendorfer Krankenhauses, S. 198. Leipzig und Hamburg, Verlag von L. Voss, 1914. — 8) *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **90**, 12, 1914. — 9) *Derselbe*, Mitt. a. d. Hamburger Staats-Krankenanstalten **12**, 197, 1911. — 10) *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **96**, 183, 1915. — 11) *Derselbe*, ebendaselbst **98**, 65, 1916. — 12) *Derselbe*, ebendaselbst **97**, 102, 1916. — 13) *Derselbe*, ebendaselbst **87**, 171, 1913. — 14) *E. Rordellus* und *O. Schumm*, Zeitschr. f. urolog. Chirurg. **3**, 126, 1914. — 15) *O. Schumm*, ebendaselbst **3**, 125, 1914. — 16) *H. Fischer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **97**, 148, 1916. — 17) *Derselbe*, Münch. med. Wochenschr. 1916, Nr. 11, S. 877. — 18) *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **95**, 334, 1915. — 19) *Derselbe*, ebendaselbst **97**, 109, 1916. — 20) *Derselbe*, Über Blut und Gallenfarbstoff; *L. Ascher* und *K. Spiro*, Ergebn. d. Physiol., XV. Jahrg., 3., S. 185—791, 1916. — 21) *H. Fischer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **96**, 148, 1915/16. — 22) *H. Gunther*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **105**, 89, 20. Dezember 1911. — 23) *C. Hegler*, *Eug. Fränkel*, *O. Schumm*, Deutsch. med. Wochenschr. 1913, Nr. 18. — 24) *M. Schmey*, Frankfurter Zeitschr. f. Path. **12**, 232, 1913. — 25) *O. R. Teutoschländer*, Virchows Arch. f. path. Anat. **217**, 393, 1914. — 26) *A. Malaski* und *Marchlewski*, diese Zeitschr. **24**, 319, 1910. — 27) *L. Marchlewski*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**, 33, 1914. — 28) *A. E. Garrod*, Journ. of physiol. Chem. **13**, 598, 1892. — 29) *Garrod* und *Hopkins*, Journ. of pathol. and bacteriol. **3**, 434, 1896. — 30) *A. F. Garrod*, Journ. of physiol. Chem. **15**, 108, 1893; **17**, 349, 1895.

Über die Ausscheidung von Chlorophyllderivaten aus dem Urin. III.

Von

Yoshitaka Kitahara.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1924.)

Im menschlichen Urin hat man schon vor längerer Zeit das gelegentliche Auftreten eines rötlichen Farbstoffs beobachtet, und es war leicht möglich, nachzuweisen, daß das Erscheinen dieser Substanz in einem ursächlichen Zusammenhang mit dem Genuß von rohem Fleisch und namentlich von grünen Gemüsen stand.

Der Stoff wurde zunächst als Hämatoporphyrin angesprochen, vornehmlich von *Hopkins* und *Stokwis*, dann aber auch von verschiedenen anderen Autoren, obwohl *v. Nenski* diese Ansicht von Anfang an unter Hinweis auf die *Marchlewski*schen Untersuchungen bekämpft hatte. Auch bei Sulfonal-, Trional- und Tetronalvergiftungen sah man das Auftreten eines ähnlichen Farbstoffs im Urin, den man eine lange Zeit hindurch als identisch mit der nach Genuß von grünem Gemüse auftretenden Substanz betrachtet hatte. In der neueren Zeit bezeichnet man die rötlichen Farbstoffe des Urins im allgemeinen als Porphyrine und nicht mehr direkt als Hämatoporphyrin, und man nimmt wohl mit Recht an, daß es sich hier um eine Vielheit von Substanzen handele.

Hofstetter und *Godinho* haben auf Anregung *Bürgis* die Frage nach dem ursächlichen Zusammenhang zwischen dem Genuß von grünem Gemüse und dem Erscheinen von Porphyrinen im Urin genauer untersucht. *Hofstetter* gab den Versuchspersonen ein nicht ganz gereinigtes Chlorophyll und konnte zeigen, daß das Auftreten des roten Körpers nach Genuß einer bestimmten Menge Blattgrüns regelmäßig zu beobachten war, also von der Quantität der aufgenommenen Substanz direkt abhängig ist. Ich will auf diese Arbeit im übrigen hier nicht eingehen, weil sie in den Mitteilungen *Godinhos* schon genauer berücksichtigt worden ist.

Godinho gab überhaupt eine gründlichere Darlegung der Literatur, auf die hier verwiesen sein soll. *Godinho* nahm dann einige Selbstversuche mit chemisch reinem Phäophytin vor und zeigte wiederum, daß die Ausscheidung der roten Substanz durch den Urin in einem ziemlich bestimmten quantitativen Verhältnis zu der Menge des eingenommenen Chlorophylls stand.

Nach diesen Untersuchungen schien es durchaus klar, daß der ausgeschiedene Stoff als Derivat des resorbierten Blattgrüns anzusehen ist, und da es auf eine andere Weise kaum möglich erscheint, über die Aufnahme von Chlorophyll vom Darmkanal aus Aufschluß zu erhalten, schien es *Bürgi* angezeigt, die Resorptionsfähigkeit von Blattgrün an Hand der Ausscheidung von Porphyrinen durch den Urin festzustellen und zu verfolgen. Über den Abbau von Chlorophyll im Darmkanal ist man sehr wenig unterrichtet. Es möge hier nur auf die Arbeiten *Marchlewskis* hingewiesen werden. Bestimmt man die Chlorophyllmenge der Nahrung und die des Stuhles, so findet man keine großen Unterschiede, so daß wohl auf eine im großen und ganzen geringfügige Resorption von Chlorophyll aus grünen Gemüsen geschlossen werden kann. Dies ist auch der Fall bei pflanzenfressenden Tieren, z. B. beim Rindvieh, dessen Urin übrigens regelmäßig Porphyrine enthält. Das Auftreten der letzteren zeigt aber mit aller Deutlichkeit, daß eine gewisse Resorption doch eintritt. Diese kann nun sehr verschieden sein, je nachdem man in der Nahrung nicht extrahiertes Chlorophyll zu sich nimmt, das zum großen Teil in Cellulosewände eingeschlossen ist, oder extrahiertes Blattgrün. Schon *Hofstetter* und *Godinho* konnten zeigen, daß bei Genuß von großen Quantitäten grüner Gemüse vornehmlich in Form von Spinat wenig oder keine Porphyrine im Urin erscheinen, und das gleiche ging aus ziemlich lange fortgesetzten Versuchen von *Bürgi* und *v. Traczewski* hervor.

Es war nun meine Aufgabe, diese Verhältnisse — namentlich in quantitativer Hinsicht — etwas genauer zu erforschen. Ich machte lauter Selbstversuche und nahm an grünen Gemüsen vornehmlich Spinat und Grünkohl zu mir und an chlorophyllhaltigen Substanzen das von *Bürgi* angegebene Chlorosan und reines Phäophytin. Die genannten Gemüse habe ich in verschiedener Zubereitung eingenommen, zum Teil roh als Salat, zum Teil gekocht. Außerdem habe ich sie ganz fein zerreiben lassen und dann den stark grün gefärbten Saft sowohl gekocht wie ungekocht zu mir genommen. Außerdem nahm ich an den Tagen, an denen ich die Ausscheidung nach Einnahme der genannten Stoffe prüfen wollte, niemals grünes Gemüse in irgend einer Form zu mir. Ebenso vermied ich den Genuß von rohem Fleisch. Die grünen Gemüse, die ich aß, wurden vor der Einnahme möglichst genau gewogen.

Die Untersuchung des Urins geschah in der folgenden Weise: War er alkalisch, so wurde er mit Essigsäure angesäuert, hierauf mit Bleizucker versetzt, abfiltriert und der Filterrückstand mit einer in der folgenden Weise hergestellten Lösung extrahiert: 90proz. Alkohol wird mit konzentrierter Salzsäure versetzt, bis das Gemenge Kongorotpapier schön blau färbt. Mit diesem Reagens wird der Rückstand stark geschüttelt und dann 24 Stunden stehengelassen. Falls der in Frage kommende Farbstoff vorhanden ist, färbt sich die Flüssigkeit über dem Rückstand rosarot.

In meinen Tabellen bedeutet

— keine Reaktion,
\+ schwache Reaktion,
++ starke Reaktion.

Ich möchte noch beifügen, daß man den roten Farbstoff im Urin gewöhnlich schon erkennt, ohne ihn in der genannten Weise isoliert zu haben.

Ich lasse nun zunächst meine Resultate folgen:

Versuch 1. 11. Oktober 1921.

Frühstück: ½ Liter Milch, 1 Tasse Kaffee mit Zucker, 50 g Brot mit Butter. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 200 g gekochten Spinat, 150 g Fleisch, 50 g Reis. — Abendessen: 300 g Reis, 50 g Schinken.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	70,0	hellgelb	—
2 Stunden	30,0	„	—
3 „	25,0	„	—
4 „	25,0	„	—
6 „	200,0	„	—
8 „	70,0	„	—
12 „	200,0	„	—
20 „	300,0	„	—

Versuch 2. 12. Oktober 1921.

Frühstück: 20 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 300 g gekochten Spinat, 300 g Reis, 30 g Fisch. — Abendessen: 200 g Reis, 120 g Kalbfleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	300,0	hellgelb	—
2 Stunden	200,0	„	—
3 „	30,0	„	—
4 „	40,0	„	—
6 „	150,0	„	—
8 „	120,0	„	—
12 „	400,0	„	—
20 „	300,0	„	—

Versuch 3. 13. Oktober 1921.

Frühstück: 500 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 300 g gekochten Grünkohl, 100 g Reis, 120 g Kalbfleisch. — Abendessen: 200 g Reis, 200 g Kastanien, 40 g Schinken.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	150,0	hellgelb	—
2 Stunden	170,0	„	—
3 „	30,0	„	—
4 „	150,0	„	—
6 „	400,0	„	—
8 „	50,0	„	—
12 „	150,0	„	—
20 „	200,0	„	—

Versuch 4. 14. Oktober 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 200 g Reis, 500 g gekochten Spinat, 125 g Fleisch. — Abendessen: 100 g Fleisch, 300 g Reis.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	120,0	hellgelb	—
2 Stunden	150,0	„	—
3 „	50,0	„	—
4 „	30,0	„	—
6 „	300,0	„	—
8 „	150,0	„	—
12 „	250,0	„	—

Versuch 5. 15. Oktober 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 400 g gekochten Grünkohl, 100 g Reis, 125 g Fleisch. — Abendessen: 300 g Reis, 1 gekochtes Ei, 30 g Brot mit Butter.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	300,0	hellgelb	—
2 Stunden	50,0	„	—
3 „	25,0	„	—
4 „	250,0	„	—
6 „	100,0	„	—
8 „	70,0	„	—
12 „	300,0	„	—

Versuch 6. 18. Oktober 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 120 g Kalbfleisch, 200 g rohen Spinat, 200 g Reis. — Abendessen: 200 g Reis, 100 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	100,0	hellgelb	—
2 Stunden	30,0	"	—
3 "	20,0	"	—
4 "	50,0	"	—
6 "	150,0	"	—
8 "	100,0	"	—
12 "	300,0	"	—
20 "	350,0	"	—

Versuch 7. 19. Oktober 1921.

Frühstück: 75 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 125 g Fleisch, 300 g rohen Spinat, 200 g Reis. — Abendessen: 300 g Reis, 100 g Schinken.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	200,0	hellgelb	—
2 Stunden	50,0	"	—
3 "	30,0	"	—
4 "	40,0	"	—
6 "	150,0	"	—
8 "	200,0	"	—
12 "	300,0	"	—
20 "	400,0	"	—

Versuch 8. 20. Oktober 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 3 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 200 g Reis, 300 g Saft von zerriebenem, ungekochtem Grünkohl. — Abendessen: 300 g Reis, 100 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	100,0	hellgelb	—
2 Stunden	50,0	"	+
3 "	20,0	"	+
4 "	50,0	"	—
6 "	40,0	"	—
8 "	150,0	"	—
12 "	200,0	"	—
20 "	400,0	"	—

Versuch 9. 21. Oktober 1921.

Frühstück: 75 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 200 g Reis, 300 g rohen Grünkohl. — Abendessen: 200 g Reis, 100 g Schinken.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	150,0	hellgelb	—
2 Stunden	50,0	"	—
3 "	40,0	"	—
4 "	30,0	"	—
6 "	150,0	"	—
8 "	100,0	"	—
12 "	300,0	"	—
20 "	350,0	"	—

Versuch 10. 22. Oktober 1921.

Frühstück: 75 g Brot mit Butter, 3 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 100 g Reis, 400 g Saft von zerriebenem, rohem Grünkohl. — Abendessen: 300 g Reis, 125 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	150,0	hellgelb	+
2 Stunden	50,0	"	+
3 "	60,0	"	++
4 "	30,0	"	—
6 "	200,0	"	—
8 "	150,0	"	—
12 "	300,0	"	—
20 "	400,0	"	—

Versuch 11. 25. Oktober 1921.

Frühstück: 25 g Brot mit Butter, 3 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 500 g Saft von zerriebenem, gekochtem Grünkohl, 100 g Reis, 125 g Fleisch. — Abendessen: 125 g Fleisch, 300 g Reis.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	150,0	hellgelb	—
2 Stunden	40,0	"	—
3 "	30,0	"	—
4 "	100,0	"	—
6 "	200,0	"	—
8 "	150,0	"	—
12 "	300,0	"	—
20 "	450,0	"	—

Versuch 12. 26. Oktober 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — **Mittagessen:** 1 Teller Suppe, 300 g Saft von zerriebenem, rohem Spinat, 200 g Reis, 125 g Fleisch. — **Abendessen:** 200 g Reis, 80 g Schinken.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	100,0	hellgelb	—
2 Stunden	40,0	"	+
3 "	30,0	"	++
4 "	80,0	"	+
6 "	100,0	"	—
8 "	150,0	"	—
12 "	300,0	"	—
20 "	400,0	"	—

Versuch 13. 27. Oktober 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 400 g gekochter Saft von 400 g Spinat, 200 g Reis, 125 g Fleisch. — Abendessen: 200 g Reis, 120 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	100,0	hellgelb	—
2 Stunden	40,0	"	—
3 "	30,0	"	—
4 "	40,0	"	—
6 "	200,0	"	—
8 "	300,0	"	—
12 "	400,0	"	—
20 "	450,0	"	—

Versuch 14. 28. Oktober 1921.

Frühstück: 75 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, Saft von 100 g zerriebenem, rohem Spinat, 300 g Reis, 120 g Rindfleisch. — Abendessen: 300 g Reis, 120 g Kalbfleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	100,0	hellgelb	—
2 Stunden	80,0	"	+
3 "	40,0	"	—
4 "	30,0	"	—
6 "	150,0	"	—
8 "	200,0	"	—
12 "	300,0	"	—
20 "	400,0	"	—

Versuch 15. 29. Oktober 1921.

Frühstück: 90 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, Saft von 200 g zerriebenem, rohem Spinat, 200 g Reis, 60 g Fleisch. — Abendessen: 100 g Fleisch, 300 g Reis.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	150,0	hellgelb	—
2 Stunden	100,0	"	+
3 "	50,0	"	+
4 "	30,0	"	—
6 "	20,0	"	—
8 "	100,0	"	—

Versuch 16. 1. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, Saft von 200 g zerriebenem, ungekochtem Grünkohl, 200 g Reis, 125 g Fleisch. — Abendessen: 200 g Reis, 200 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	200,0	hellgelb	—
2 Stunden	100,0	"	+
3 "	30,0	"	+
4 "	25,0	"	—
6 "	150,0	"	—
8 "	200,0	"	—
12 "	350,0	"	—
20 "	400,0	"	—

Versuch 17. 2. November 1921.

Frühstück: 75 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, Saft von 100 g zerriebenem, ungekochtem Grünkohl, 200 g Reis, 125 g Fleisch. — Abendessen: 300 g Reis, 125 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	250,0	hellgelb	—
2 Stunden	100,0	"	+
3 "	40,0	"	—
4 "	30,0	"	—
6 "	200,0	"	—
8 "	150,0	"	—
12 "	300,0	"	—
20 "	450,0	"	—

Versuch 18. 3. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, Saft von 300 g zerriebenem, ungekochtem Spinat, 125 g Fleisch, 200 g Reis. — Abendessen: 200 g Reis, 200 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	200,0	hellgelb	—
2 Stunden	150,0	„	++
3 „	40,0	„	++
4 „	35,0	„	—

Versuch 19. 4. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, Saft von 200 g zerriebenem, ungekochtem Spinat, 200 g Reis, 125 g Fleisch. — Abendessen: 200 g Reis, 125 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	150,0	hellgelb	—
2 Stunden	100,0	„	+
3 „	60,0	„	+
4 „	30,0	„	—

Versuch 20. 5. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, Saft von 800 g zerriebenem, ungekochtem Spinat, 125 g Fleisch, 100 g Reis. — Abendessen: 200 g Reis, 125 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	50,0	hellgelb	—
2 Stunden	30,0	„	—
3 „	35,0	„	—
4 „	20,0	„	—

Versuch 21. 8. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, Saft von 100 g zerriebenem, ungekochtem Spinat, 100 g Reis, 150 g Fleisch. — Abendessen: 200 g Reis, 125 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	50,0	hellgelb	—
2 Stunden	30,0	„	+
3 „	25,0	„	—
4 „	40,0	„	—
6 „	100,0	„	—
8 „	300,0	„	—
12 „	400,0	„	—
20 „	450,0	„	—

Versuch 22. 9. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, Saft von 200 g zerriebenem, ungekochtem Spinat, 100 g Reis, 125 g Fleisch. — Abendessen: 100 g Reis 125 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	40,0	hellgelb	—
2 Stunden	35,0	"	+
3 "	50,0	"	+
4 "	20,0	"	—

Versuch 23. 10. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, Saft von 300 g zerriebenem, ungekochtem Spinat, 130 g Fleisch, 100 g Reis. — Abendessen: 125 g Fleisch, 100 g Reis.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	150,0	hellgelb	—
2 Stunden	40,0	"	+
3 "	60,0	"	++
4 "	45,0	"	—

Versuch 24. 11. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, Saft von 300 g zerriebenem, ungekochtem Grünkohl, 200 g Reis, 100 g Fleisch. — Abendessen: 200 g Fleisch, 200 g Reis.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	200,0	hellgelb	—
2 Stunden	50,0	"	+
3 "	30,0	"	++
4 "	30,0	"	+
6 "	300,0	"	—
8 "	250,0	"	—

Versuch 25. 12. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, Saft von 80 g zerriebenem, ungekochtem Grünkohl, 150 g Fleisch, 200 g Reis. — Abendessen: 200 g Reis, 125 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	100,0	hellgelb	—
2 Stunden	40,0	"	—
3 "	40,0	"	—
4 "	60,0	"	—

Versuch 26. 15. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, Saft von 100 g zerriebenem, ungekochtem Grünkohl, 200 g Reis, 125 g Fleisch. — Abendessen: 200 g Reis, 125 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	200,0	hellgelb	—
2 Stunden	30,0	„	—
3 „	25,0	„	+
4 „	20,0	„	—

Versuch 27. 16. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, Saft von 200 g zerriebenem, ungekochtem Grünkohl, 200 g Reis, 100 g Fleisch. — Abendessen: 200 g Reis, 125 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	100,0	hellgelb	—
2 Stunden	70,0	„	+
3 „	35,0	„	+
4 „	40,0	„	—

Versuch 28. 18. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 6 Pastillen Chlorosan, 200 g Reis, 150 g Fleisch. — Abendessen: 200 g Reis, 125 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	300,0	hellgelb	—
2 Stunden	100,0	„	—
3 „	60,0	„	—
4 „	30,0	„	—

Versuch 29. 19. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 12 Pastillen Chlorosan, 100 g Fleisch, 150 g Reis. — Abendessen: 250 g Fleisch, 125 g Reis.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	250,0	hellgelb	+
2 Stunden	150,0	„	+
3 „	50,0	„	+
4 „	30,0	„	—

Versuch 30. 22. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 24 Pastillen Chlorosan, 150 g Fleisch, 100 g Reis. — Abendessen: 100 g Reis, 125 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	300,0	hellgelb	++
2 Stunden	100,0	„	++
3 „	40,0	„	+
4 „	30,0	„	+

Versuch 31. 23. November 1921.

Frühstück: 50 g Brot mit Butter, 2 Tassen Kaffee mit Zucker, ½ Liter Milch. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 30 Pastillen Chlorosan, 200 g Reis, 150 g Fleisch. — Abendessen: 150 g Reis, 125 g Fleisch.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	200,0	hellgelb	+
2 Stunden	150,0	„	++
3 „	50,0	„	++
4 „	30,0	„	—

Versuch 32. 13. Dezember 1921.

Frühstück: 1 Ei, 2 Tassen Kaffee mit Zucker. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 125 g Fleisch, 200 g Reis, 0,2 g Phäophytin. — Abendessen: 120 g Fleisch, 150 g Reis.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	80,0	hellgelb	—
2 Stunden	50,0	„	+
3 „	35,0	„	+
4 „	30,0	„	—

Versuch 33. 14. Dezember 1921.

Frühstück: 1 Ei, 2 Tassen Kaffee mit Zucker. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 125 g Fleisch, 200 g Reis, 0,2 g Phäophytin. — Abendessen: 120 g Fleisch, 150 g Reis.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	70,0	hellgelb	—
2 Stunden	60,0	„	++
3 „	40,0	„	+
4 „	35,0	„	—

Versuch 34. 15. Dezember 1921.

Frühstück: 1 Ei, 2 Tassen Kaffee mit Zucker. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 130 g Fleisch, 200 g Reis, 1,0 g Phäophytin. — Abendessen: 120 g Fleisch, 150 g Reis.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	60,0	hellgelb	—
2 Stunden	40,0	"	+
3 "	50,0	"	+
4 "	35,0	"	—
25 "	50,0	"	—
26 "	50,0	"	—
27 "	30,0	"	—
28 "	25,0	"	—

Versuch 35. 17. Dezember 1921.

Frühstück: 1 Ei, 2 Tassen Kaffee mit Zucker. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 125 g Fleisch, 100 g Reis, 1,0 g Phäophytin.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	150,0	hellgelb	—
2 Stunden	50,0	"	+
3 "	30,0	"	+
4 "	25,0	"	—

Versuch 36. 20. Dezember 1921.

Frühstück: 1 Ei, 2 Tassen Tee mit Zucker. — Mittagessen: 1 Teller Suppe, 200 g Fleisch, 0,5 g Phäophytin.

Untersuchungszeit nach Aufnahme	Harnmenge ccm	Farbe	Resultat
1 Stunde	200,0	hellgelb	—
2 Stunden	100,0	"	+
3 "	60,0	"	++
4 "	30,0	"	—

Nummer des Versuchs	Gemüse	Form	Dosis g	Zahl der Stunden nach Aufnahme							
				1	2	3	4	6	8	12	20
1	Spinat	gekocht	200	—	—	—	—	—	—	—	—
2	"	"	300	—	—	—	—	—	—	—	—
4	"	"	500	—	—	—	—	—	—	—	
3	Grünkohl . . .	"	300	—	—	—	—	—	—	—	—
5	" . . .	"	400	—	—	—	—	—	—	—	
6	Spinat	roh	200	—	—	—	—	—	—	—	
7	"	"	300	—	—	—	—	—	—	—	
9	Grünkohl . . .	"	300	—	—	—	—	—	—	—	
13	Spinatsaft . .	gekocht	400	—	—	—	—	—	—	—	
11	Grünkohlsaft .	"	500	—	—	—	—	—	—	—	
20	Spinatsaft . .	ungekocht	80	—	—	—	—				

Nummer des Versuchs	Gemüse	Form	Dosis	Zahl der Stunden nach Aufnahme							
			g	1	2	3	4	6	8	12	20
14	Spinatsaft . .	ungekocht	100	—	+	—	—	—	—	—	
21	„ . .	„	100	—	+	—	—	—	—	—	
15	„ . .	„	200	—	+	+	—	—	—		
19	„ . .	„	200	—	+	+	—				
22	„ . .	„	200	—	+	+	—				
18	„ . .	„	300	—	++	++	—				
12	„ . .	„	300	—	+	++	+	—	—	—	
23	„ . .	„	300	—	+	++	—				
25	Grünkohlsaft .	„	80	—	—	—	—				
26	„ .	„	100	—	—	+	—				
17	„ .	„	100	—	+	—	—	—	—	—	—
16	„ .	„	200	—	+	+	—	—	—	—	
27	„ .	„	200	—	+	+	—				
24	„ .	„	300	—	+	++	+	—	—		
8	„ .	„	300	—	+	+	—	—	—	—	
10	„ .	„	400	+	+	+	—	—	—	—	
			St.								
28	Chlorosan . .	Pastillen	6	—	—	—	—				
29	„ . .	„	12	+	+	+	—				
30	„ . .	„	24	++	++	+	+				
31	„ . .	„	30	+	++	++	—				
			g								
32	Phaeophytin .	Pulver	0,2	—	+	+	—				
33	„ .	„	0,2	—	++	+	—				
34	„ .	„	1,0	—	+	+	—	—	—	—	
35	„ .	„	1,0	—	+	+	—				
36	„ .	„	0,5	—	+	++	—				

Die Hauptergebnisse meiner Arbeit lassen sich an Hand der Tabellen leicht überblicken. Man erkennt zunächst als das Wesentlichste, daß bei Genuß von gekochtem Spinat oder Grünkohl niemals eine Porphyrinausscheidung beobachtet werden konnte. Dies ist um so merkwürdiger, als ich doch sehr große Mengen Gemüse zu mir genommen habe, z. B. bis zu 500 g Spinat und bis zu 400 g Grünkohl. Das Ergebnis war ebenso negativ, wenn ich diese beiden Gemüse roh in Form von Salat zu mir nahm. Etwas andere Resultate erhielt ich bei Einnahme des aus diesen Gemüsen hergestellten Saftes, der — wie ich eingangs schon erwähnt habe — bei der von mir gewählten Zubereitungsweise stark grün gefärbt war. Nahm ich diesen Saft gekocht zu mir, so erschienen allerdings auch keine Porphyrine, wohl aber, wenn ich ihn ungekocht zu mir nahm. Die Porphyrinausscheidung stand dann in einem direkten Verhältnis zu der eingenommenen Menge. Sie war z. B., wenn ich Spinatsaft nahm, negativ bei Einnahme von 80 g, schwach positiv bei 100 g und sehr stark positiv bei 300 g. Die mit Grünkohlsaft erhaltenen Resultate waren den mit Spinatsaft bekommenen so ähnlich, daß ich sie hier nicht noch ausdrücklich besprechen muß.

Von besonderem Interesse waren die mit Chlorosan erhaltenen Resultate. Bevor ich auf sie eingehe, scheint es zweckmäßig, die in verschiedener Form aufgenommenen Chlorophyllmengen kurz anzuführen. Sowohl Spinat wie Grünkohl sind sehr verschieden chlorophyllhaltig. Je wasserreicher sie sind, desto geringer ist natürlich prozentual der Chlorophyllgehalt, doch ist er auch sonst nicht konstant. Man kann sagen, daß 100 bis 500 g Spinat, wenn er wenig chlorophyllhaltig ist, 90 bis 430 mg Reinchlorophyll enthalten, doch kann die Menge auch 175 bis 875 mg betragen. 100 bis 500 g Grünkohl enthalten etwa 85 bis 420 mg Chlorophyll. Nach *W. Löffler* ist in einer Chlorosantablette 1,25 mg Reinchlorophyll enthalten. Wir wollen hier auf diese Zahl abstellen. Aus der Kontroverse zwischen *Bürgi* und *Löffler* geht zwar hervor, daß man den Chlorophyllgehalt der Pastillen beträchtlich höher einschätzen kann. Bei den von *Bürgi* gegebenen Zahlen sind aber auch die Abbauprodukte des Chlorophylls mitgerechnet, die therapeutisch zweifelsohne in Frage kommen, für die Porphyrinausscheidung vielleicht aber nicht.

Wenn ich auf einmal sechs Pastillen Chlorosan zu mir nahm, so konnte ich keine Porphyrinausscheidung feststellen. Bei einer Einnahme von 12 Pastillen wurde sie viel stärker, als ich sie sonst überhaupt beobachtet habe. 12 Pastillen enthalten nach der gegebenen Zahl 15 mg Reinchlorophyll, 24 Pastillen dementsprechend 30 mg. Wenn man nun bedenkt, daß ich mit 430 bis 875 mg Chlorophyll, in Form von gekochtem Spinat genommen, keine Porphyrinausscheidung beobachten konnte, dagegen mit 15 bis 30 mg in Form von Chlorosan genommenem Blattgrün eine außerordentlich starke, so sieht man ohne weiteres, daß nur das aus seinen Cellulosewänden befreite Chlorophyll in nennenswerter Menge resorbiert wird. Der Unterschied ist ein so enormer, daß diese Behauptung gesichert erscheint.

Wenn ich Phäophytin zu mir nahm, so erhielt ich mit 0,2 g eine deutliche Porphyrinreaktion, mit 0,5 bis 1 g eine noch stärkere. Doch war die Reaktion nicht so stark wie die mit Chlorosan erhaltene. Vielleicht ist das Phäophytin an sich seiner physikalischen Eigenschaften wegen nicht so gut zur Resorption geeignet. Vielleicht helfen auch die Nebensubstanzen, die in dem ungereinigten Chlorophyll des Chlorosans vorhanden sind, mit, um die Substanz aufnahmefähiger zu machen. Jedenfalls wird das Phäophytin doch z. B. resorbiert, während meinen Untersuchungen nach aus Gemüse Chlorophyll nur dann resorbiert wird, wenn man es durch feines Zerreiben aus der Cellulose frei macht und in einen Saft hineingebracht hat.

Es ist mir leider nicht möglich zu sagen, wieviel Chlorophyll in den von mir hergestellten Gemüsesäften vorhanden war. Aber auch in diesen Versuchen zeigt sich die Abhängigkeit der Porphyrin-

ausscheidung von der Quantität des aufgenommenen Chlorophylls deutlich.

Ich muß schließlich noch bemerken, daß sowohl *Bürgi* und *v. Traczewski* sowie *Godinho* gelegentlich bei Einnahme größerer Gemüsemengen Porphyrinreaktionen im Urin beobachtet hatten. Ich kann diesen teilweisen Widerspruch zu meinen Ergebnissen nur aus individuellen Verschiedenheiten erklären. Im wesentlichen stimmen aber meine Resultate mit den von den anderen genannten Autoren vollkommen überein. Sie zeigen deutlich, daß das Gemüsechlorophyll, wenn es in der üblichen Art aufgenommen wird, nicht oder kaum resorbiert wird, und daß sich daher eine Chlorophylltherapie nur mit extrahiertem Blattgrün durchführen läßt.

Die Bestimmung der Oberflächenspannung mit der Ringmethode (Torsionswage).

Von

P. Lecomte du Noüy, Sc. D.

(Aus den Laboratorien des Rockefeller Institute for Medical Research, New York.)

(Eingegangen am 7. Dezember 1924.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Seit 1919 wurden in diesem Laboratorium mittels des von mir zuerst im Journal of General Physiology **1**, 521, 1918/19 beschriebenen Apparates ungefähr 60000 Bestimmungen der Oberflächenspannung kolloider Flüssigkeiten, hauptsächlich des Blutserums, ausgeführt. Dieser Apparat, der auf der Ringmethode basiert und wie eine Torsionswage arbeitet, ist seitdem verschiedentlich von anderer Seite mehr oder weniger nachgeahmt, soviel mir aber bekannt ist, nicht verbessert worden. Es besteht im Gegenteil kein Zweifel, daß einige dieser Modelle mangelhaft sind. Da die erste Beschreibung des Instrumentes in einer amerikanischen Zeitschrift erschien, die von Kolloid- und Biochemikern in Europa vielleicht selten gelesen wird, so mag eine kurze Schilderung der

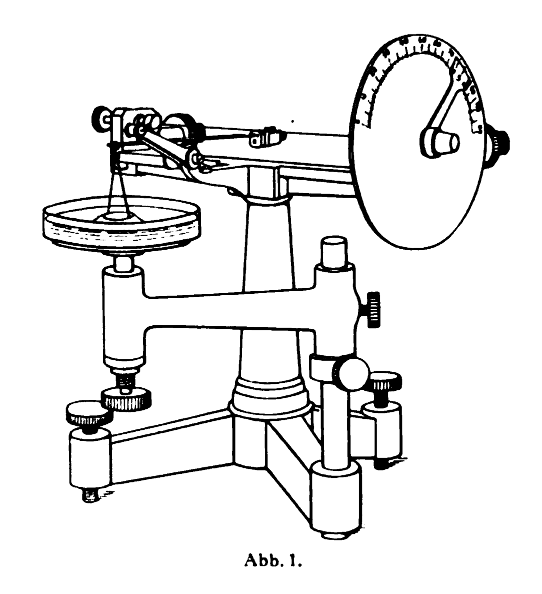


Abb. 1.

Technik, die zu einem besseren Verständnis des Oberflächengleichgewichts kolloider und gemischter Lösungen führte, sowie auch eine Zusammenstellung der ganzen Literatur dieses Gebietes, von Interesse sein.

Mittels des Tensiometers in seiner neuesten Form (Abb. 1) ist es möglich, ohne irgendwelche Berechnung, direkte Oberflächenspannungswerte in Dynen pro Zentimeter zu erhalten, und zwar mit einer (für die betreffende Versuchstemperatur) Genauigkeit, wie sie bisher mit keiner Methode mit solcher Geschwindigkeit (15 bis 20 Sekunden) und Leichtigkeit zu erzielen war.

Man mißt also mit dem „Tensiometer" diejenige Kraft, direkt in Dynen ausgedrückt, die die Oberflächenschicht der Probelösung auf den Ring ausübt, wenn derselbe aus der Flüssigkeit, in die er eingetaucht war, herausgezogen wird. Bei dieser Methode spielen keine komplizierenden Faktoren, wie z. B. der Randwinkel, mit hinein, und bei Anwendung der unten beschriebenen Technik ist es möglich, für reine Flüssigkeiten Werte zu erzielen, die mit den Resultaten irgend einer anderen, den strengsten Genauigkeitsbedingungen unterliegenden Methode innerhalb einer Grenze von 0,1 Dyn übereinstimmen.

Tabelle I.

Oberflächenspannung des Wassers bei 18°.
(*H. Freundlich*, Kapillarchemie.)

Methode	σ	Beobachter
Schwingende Strahlen	73,0	*Rayleigh*
„ „	73,8	*Pedersen*
„ „	72,4	*Bohr*
„ Tropfen	73,0	*Lenard*
Kapillarwellen	74,0	*Rayleigh*
„	73,3	*Dorsey*
„	73,8	*Kalähne*
Gekrümmte Oberflächen . . .	73,5	*Lohnstein*
Flache Luftblasen	73,0	*Quincke* (ber. n. *Worthington*)
Steighöhe	73,1	*Volkmann*
Adhäsionsring aus Kupfer . .	76,8	*Weinberg*
Adhäsionsplatte	73,1	*Hall*
Tropfengewicht	73,8	*Ollivier* (ber. n. *Lohnstein*)
Blasendruck	75,2	*Cantor*
„	73,7	*Magini*
„	72,7	*F. M. Jäger*
Ringtensiometer, *du Noüy* . .	73,7	*Klopsteg*

Natürlich ist es möglich, *Weinbergs* Werte unter Anwendung einer etwas einfacheren Technik mit dem Tensiometer zu kontrollieren. Dr. *P. E. Klopsteg* hat jedoch gezeigt, daß die niedrigeren Werte wahrscheinlich richtiger sind.

Technik.

Eine Bedingung zur Erlangung gleichmäßiger Resultate ist die sorgfältige Reinigung der Glasgefäße, die bei den Messungen gebraucht werden. Die Gefäße müssen in einer starken Reinigungsflüssigkeit (15 oder 20 ccm einer gesättigten Kaliumbichromatlösung auf 1000 ccm Schwefelsäure) gekocht und dann mit destilliertem Wasser, welches in reinen, fettfreien Flaschen aufbewahrt wird, abgespült werden. Sollten die Gefäße (z. B. Uhrgläser) nicht vollständig benetzbar sein, so kann man sie 1 oder 2 Sekunden lang über eine Bunsenflamme halten. Weder Alkohol noch Äther sollte gebraucht werden. Der Platinring sollte nach jeder Messung in Wasser getaucht und über eine Flamme gehalten werden.

Durch Auflegung eines Gewichtes von bekannter Größe (z. B. 700 mg) auf den Ring läßt sich das Instrument leicht und genau eichen. Kennt man den genauen Umfang des Ringes (sagen wir 4 cm), so gibt uns die folgende Formel den Wert für die Oberflächenspannung (die gleiche Zahl sollte auch mit Hilfe des Nonius auf dem Zifferblatt abgelesen werden, damit eine direkte Lesung des Tensiometers erzielt wird):

$$\sigma = \frac{mg}{2L}$$

worin

σ = Oberflächenspannung in Dyn pro Zentimeter,
m = die auf den Ring gelegte Masse in Grammen,
g = 981,
L = Peripherie des Ringes (4 cm)

ist.

Man erhält so eine willkürliche Zahl, und der Nonius wird auf diese Zahl des Zifferblattes gesetzt. Sodann verkürzt oder verlängert man mittels einer Mikrometerschraube den Arm, welcher den Ring hält, bis zur Erzielung der absoluten Nullstellung. Dieses Verfahren nimmt ungefähr 10 Minuten in Anspruch. Man hat dann das Tensiometer geeicht ohne Gebrauch einer Standardflüssigkeit. Die Ablesungen stellen direkt die Anzahl Dynen pro Zentimeter Oberfläche dar. Die Torsion des Drahtes ist pro Grad der Drehung im Gesamtbereich der Skala konstant.

Man kann natürlich das Instrument auch mittels einer Bezugsflüssigkeit, wie z. B. Wasser bei bestimmter Temperatur, eichen, unter Zugrundelegung eines zuverlässigen Wertes für die Oberflächenspannung des Wassers bei der betreffenden Temperatur. Für Temperaturen um 20° C darf die Addition von 0,17 Dyn pro Grad unterhalb 20° und Subtraktion von 0,17 Dyn pro Grad oberhalb 20° als genügend genaue Korrektur für Wasser betrachtet werden.

Ausführung einer Bestimmung.

Bei einer genauen Messung wird die auf dem Tische in Uhrgläschen sich befindende Flüssigkeit mit Hilfe der Mikrometerschraube so weit gehoben, daß der Ring die Flüssigkeit berührt. Der Ring wird dann weggezogen und der Nullpunkt eingestellt, während die Tröpfchen noch am Ringe hängen. Das Gewicht dieser Tröpfchen ist nahezu konstant (ungefähr 0,24 Dyn pro Zentimeter Länge des Drahtes im Ringe). Hierdurch wird der Fehler, der durch die am Ringe haftenden Tröpfchen verursacht wird, ausgeglichen. Dann wird der Knopf, der die Drehung des Torsionsdrahtes bewirkt, so gedreht, daß der Nonius sich auf der Skala nach oben bewegt. Gleichzeitig wird der Tisch, auf dem die Flüssigkeit steht, langsam mittels der Schraube gesenkt, damit der Arm stets in seiner Gleichgewichtsstellung im Nullpunkt gehalten wird. Sowie die Torsion des Drahtes sich dem Werte nähert, bei dem das Häutchen anfängt sich zu bilden, werden die Schrauben sehr langsam und vorsichtig gedreht. Bei Zerreißen des Häutchens zeigt der Nonius die Oberflächenspannung bis auf $\pm$0,05 Dyn pro Zentimeter an. Will man nur relative Werte haben, so wird der Tisch nicht bewegt, und man benutzt nur den Knopf, der die Drehung des Torsionsdrahtes bewirkt. Auf diese Weise hat *Weinberg* seine Resultate erzielt.

Anwendung auf kolloide Lösungen.

In Bezug auf kolloide Lösungen hat Verfasser gezeigt[1]), daß deren Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Zeit erniedrigt wird, und daß mit Verdünnung die Erniedrigung bis zur Erreichung eines gewissen Maximums zunimmt. Die Untersuchung dieser Erniedrigung oder dieses „zeitlichen Abfalls" (time-drop) wurde in Versuchen über Antikörperbildung bei immunisierten Tieren mit Erfolg angewandt. In diesen Versuchen wurde das Serum 1 : 10000 verdünnt. Es war ebenfalls möglich, ein Kriterium für monomolekulare Schichten zu finden, und dieses Kriterium wurde bei der Größenbestimmung einiger organischer Moleküle angewandt. Bei diesen Untersuchungen ist es durchaus notwendig, die Lösungen in vollkommener Ruhe zu halten; das Tensiometer wird mittels eines auf einem Geleise rollenden Wägelchens hin und her bewegt. Anderenfalls wird das Adsorptionshäutchen

---

[1]) *P. L. du Noüy*, Journ. of exper. Med. **35**, 575, 707, 1922; **36**, 115, 547, 1922; **37**, 659, 1923; **38**, 87, 1923; **39**, 37, 717, 1924; **40**, 129, 133, 1924; Journ. of gen. Physiol. **6**, 625, 1923/24; Science **59**, 580, 1924; Phil. Mag. **48**, 264, 1924; C. r. Acad. Sci. **177**, 1140, 1923; **178**, 1102, 1924; C. r. Soc. Biol. **90**, 1450, 1924; (A New Determination of the Constant N of Avogadro, Based on its Definition) Phil. Mag. **48**, 670, 1924.

zerstört, und es können keine Beobachtungen gemacht werden. Abb. 2 zeigt das Tensiometer vor einem Tische, auf dem eine Anzahl von Lösungen in Uhrgläsern nebeneinander aufgestellt sind. In diesem

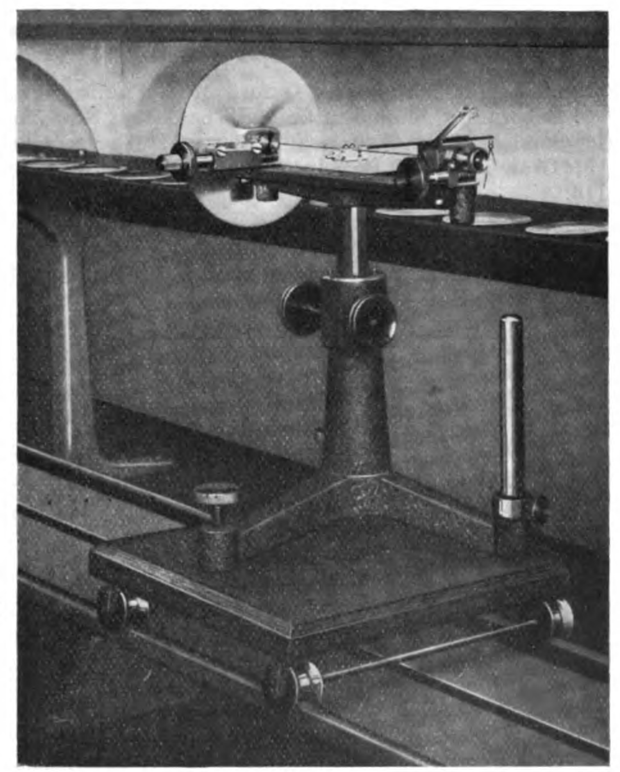


Abb. 2.

Falle wird der obere Teil des Tensiometers selbst mittels Zahn und Trieb gehoben und gesenkt, damit die Lösungen nicht erschüttert werden.

Da über die Probleme, die unter Anwendung des Tensiometers untersucht worden sind, in einer langen Reihe von Berichten ausführlich berichtet worden ist, erscheint es kaum notwendig, an dieser Stelle mehr als eine kurze Zusammenfassung zu geben. Eine beigefügte Literaturzusammenstellung enthält jedoch Angaben über die Arbeiten des Verfassers und anderer Autoren.

Literatur über die Ringmethode.

A. Ferguson, Science Progress **9**, 428, 1915; Phil. Mag. **30**, 632, 1915; Fifth Report on Colloid Chemistry, Brit. Assoc. for the Advancement of

Science, 1923. — *Harkins* and *Brown*, Journ. Amer. Chem. Soc. **41**, 499, 1919. — *Richards* and *Carver*, ebendaselbst **43**, 827, 1921. — *P. E. Klopsteg*, Science **60**, 319, 1924. — *P. L. du Noüy*, Journ. of Gen. Physiol. **1**, 521, 1918/19.

Literatur über die Oberflächenspannung kolloider Lösungen und über das du Noüy-Tensiometer.

W. Bayliss, The Colloidal State, Oxford Med. Publications, 1923. — *H. N. Holmes*, Laboratory Manual of Colloid Chemistry, New York, Wiley, 1922. — *Zeleny* and *Erickson*, A Manual of Physical Measurements, 5th ed., New York, Mc Graw-Hill Bock Co., Inc., 1923. — *P. L. du Noüy*, s. Fußnote 1, S. 116.

Über die gravimetrische Mikrocholesterinbestimmung[1]).

Von

Tyuzi Tominaga.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Reichsuniversität zu Groningen.)

(Eingegangen am 10. Dezember 1924.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In Band 136 dieser Zeitschrift (S. 107) wurde von *A. v. Szent-Györgyi* eine gravimetrische Mikrocholesterinbestimmung beschrieben, die die Möglichkeit eröffnet, den Cholesteringehalt auch kleiner Mengen Blutes genau zu bestimmen. Die Methode dient zugleich auch als Grundlage einer titrimetrischen Bestimmung. Mit Rücksicht auf die praktische Bedeutung der Methode schien es erwünscht, die Bestimmungen zu wiederholen, um zu sehen, ob die Methode auch ohne spezielle Übung mit demselben Erfolg angewendet werden kann, und ob die genannten genauen Resultate nicht an eine genauere Kenntnis der Versuchsbedingungen gebunden sind, unter denen die Analysen ausgeführt waren.

Wie mich meine ersten Analysen belehrten, ist dies tatsächlich der Fall. Ich trachtete also, die Momente kennenzulernen und dann auch auszuschalten, durch die die Schwankungen der Resultate bedingt waren. Wie ich denke, so ist es auch gelungen, die Methode so abzuändern, daß sie auch in ungeübten Händen genaue Resultate liefern kann. Die erhaltenen Analysenresultate scheinen selbst darauf hinzuweisen, daß durch die Abänderungen die Genauigkeit der Methode noch zunahm und der ursprünglich angegebene Versuchsfehler von ± 3 Proz. noch weiter eingeengt wurde.

Es schien wünschenswert, die Methode mit einer größeren Anzahl von Probeanalysen zu belegen, um in dieser Weise ihre Genauigkeit und Leistungsfähigkeit endgültig festzustellen. Leider war

---

[1]) Diese Arbeit wurde im Dezember 1923 abgeschlossen und nach Abreisen von Herrn *Tominaga* mir anvertraut. Die Publikation wurde äußerer Umstände wegen bis jetzt zurückgehalten. *A. v. Szent-Györgyi.*

dies aber dem Verfasser vorläufig nicht möglich, da die Arbeit durch die Rückkehr in seine Heimat abgebrochen werden mußte.

Experimenteller Teil.

Die gravimetrische Mikrocholesterinbestimmung, als deren Grundlage die von *A. Windaus* entdeckte Niederschlagsbildung mit Digitonin dient, hat zwei sehr wesentliche Schwierigkeiten: die quantitative Präzipitierung und die Reinigung des Niederschlages. Die erste Frage ist durch die Arbeit von *v. Szent-Györgyi* gelöst. Auch relativ geringe Mengen von Cholesterin werden in der angegebenen Weise quantitativ präzipitiert.

Die zweite Schwierigkeit ist, wie erwähnt, die Reinigung des Niederschlages. Wie durch *Windaus* angegeben, muß zur quantitativen Präzipitierung des Cholesterins Digitonin stets in großem Überschuß zugesetzt werden. Dieses Digitonin hat unter den angegebenen Bedingungen auch eine starke Neigung zur Ausscheidung, und das ausgeschiedene Digitonin wird zum Teil durch das sehr voluminöse Präzipitat des Cholesterins eingeschlossen. Wird nun dieses Präzipitat zur Waschung auf das Asbestfilter übertragen, so ballt es sich an der Filteroberfläche zu dichteren Klumpen zusammen, die von den Waschflüssigkeiten nur sehr schwer durchdrungen werden, so daß stets die Gefahr besteht, daß Digitonin im Niederschlag eingeschlossen bleibt und zur Bestimmung gelangt. Unsere Analysen mit der genannten Mikromethode ergaben dann auch stets höhere Werte, als es die angewandte Cholesterinmenge erwarten ließ.

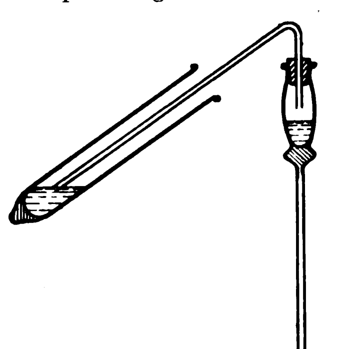


Abb. 1. Das Absaugen der Flüssigkeit. Das Filterröhrchen ist auf eine Saugflasche montiert.

Aus diesem Grunde wurde die Methode so abgeändert, daß der Niederschlag aus dem Becherchen nicht auf das Filter, sondern in ein etwa 10 ccm fassendes Zentrifugierröhrchen gespült wurde. In diesem wird nun der Niederschlag in der Waschflüssigkeit (durch Rühren mit einem Glasstäbchen) gleichmäßig suspendiert. Dann wird zentrifugiert. Die obenstehende klare Flüssigkeit mit den wenigen, etwa aufgewirbelten kleinen Flöckchen wird durch das Asbestfilter abgesaugt. Der Zentrifugenrückstand wird nun in einer neuen Menge von Waschflüssigkeit suspendiert, nochmals zentrifugiert usw. und endlich zur gravimetrischen Bestimmung auf dem Filter gewaschen, auf dem keine weitere Reinigung mehr stattfindet.

In der ersten Analysenreihe gebrauchten wir zur Waschung einmal 80 Proz. Aceton und dann dreimal erneutes Wasser. Um die Lösungsbedingungen günstiger zu gestalten, wurde das Röhrchen zwischen den Zentrifugierungen in einem Wasserbade von 45 bis 50^0 gehalten. Die Analysenresultate sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. Die erste Kolumne gibt die Menge des als Ausgangssubstanz dienenden Cholesterins in Milligrammen, Kolumne 2 gibt den Fehler, mit dem das Cholesterin zurückgefunden wurde. Zur Berechnung des Cholesterins diente der *Windaus*sche Faktor 0,2431.

Cholesterin verwendet	Fehler Proz.
0,592	+ 1,5
1,184	+ 1,4
1,776	+ 5,4
2,368	+ 3,4
2,960	+ 2,7

Wie man aus der Tabelle ersieht, ist die Übereinstimmung der Resultate eine relativ gute, selbst eine einigermaßen bessere als in der Originalmethode — die Abweichung von dem absoluten Werte ist aber eine große als Zeichen dessen, daß die Waschung keine genügende war. Dieses Resultat konnten wir dann auch mit der Beobachtung erklären, daß Wasser von 50^0 für Digitonin kein gutes Lösungsmittel ist. Wir haben also die Waschungen mit Wasser weggelassen und an Stelle dessen eine Waschung mit 80proz. Aceton eingeschaltet. Da diese Flüssigkeit kein gutes Lösungsmittel für Fette ist, haben wir auch noch einmal mit reinem Aceton gewaschen. Zur Analyse verwendeten wir zwei verschiedene Cholesterinmengen, von denen die eine in bezug auf den Cholesteringehalt von 1 ccm Blut normal, die andere klein genannt werden kann.

Cholesterin verwendet	Cholesterin gefunden	Fehler Proz.
0,595	0,600	+ 0,8
1,190	1,183	— 0,6

Die Werte sind sowohl relativ wie absolut gut übereinstimmend, das Resultat befriedigend. Es bleibt die Aufgabe einer weiteren Reihe von Probeanalysen, festzustellen, ob diese Genauigkeit eine ganz konstante ist.

Zum Schluß sei noch kurz die Methode zusammengefaßt.

Das Cholesterin wird nach der Methode von *v. Szent-Györgyi* präzipitiert. Das Präzipitat wird mit etwa 7 ccm 80proz. Acetons (mit Hilfe einer kleinen Spritzflasche) in ein etwa 10 ccm fassendes Zentri-

fugierröhrchen gespült. Dieses wird dann in etwa 45 bis 50 gräd. Wasser gesenkt[1]), hier 5 Minuten belassen, während welcher Zeit der Niederschlag mit einem dünnen Glasstäbchen mehrmals aufgewirbelt wird. Dann wird abzentrifugiert. Das Präzipitat setzt sich hierbei außerordentlich rasch, in einigen Sekunden, zu Boden. Die obenstehende Flüssigkeit wird nach der *Pregl*schen Methode (s. Abb. 1) durch das Filter abgesaugt[2]). Dann wird neues 80 proz. Aceton (etwa 7 ccm) aufgegossen und die ganze Manipulation wiederholt. Nun wiederholt man die Manipulation mit reinem Aceton, das man bei Zimmertemperatur einwirken läßt. Hiernach suspendiert man wieder bei 50° in Wasser, saugt dann nach einigen Minuten das Präzipitat auf das Filter. Das im Röhrchen zurückgebliebene Präzipitat wird mit Wasser auf das Filter gespült. Ist dies geschehen, so wird das Wasser abgesaugt, das Filter getrocknet und gewogen.

Zum Schluß sei es mir gestattet, Herrn Dr. *A. v. Szent-Györgyi* für die Anregung zu dieser Arbeit meinen Dank auszusprechen.

---

[1]) Als Wasserbad benutzten wir ein Becherglas, das mit einem Mikrobrenner erwärmt wurde.

[2]) Das Saugröhrchen sei nicht zu eng und an seinem Ende nicht spitzenförmig ausgezogen. Näheres über das Filterrohr und Wägen s. diese Zeitschr. **136**, 102.

Bemerkungen zu *M. Richter-Quittners* Mitteilung:

Über den Zuckergehalt der Blutkörperchen[1].

Von

F. Högler und K. Ueberrack.

(Aus der I. medizinischen Abteilung und dem chemischen Laboratorium des Kaiserin-Elisabeth-Hospitals in Wien.)

(Eingegangen am 13. Dezember 1924.)

In Band 150 (5. und 6. Heft) dieser Zeitschrift hat *M. Richter-Quittner* die Behauptung aufgestellt, daß unsere Angaben über den Zuckergehalt der Blutkörperchen unrichtig wären, und stützt sich dabei auf die Arbeiten von *Etienne* und *Vérain* und von *Schmidt*, die behaupten, daß man immer in den Blutkörperchen den gleichen Zuckergehalt wie im Plasma fände, wenn man die Blutkörperchen vollständig hämolysiert. Wenn diese Behauptung von *M. Richter-Quittner* richtig wäre, so würden fast alle allgemein gebräuchlichen Blutzuckerbestimmungen des Gesamtblutes um etwas zu niedrige Werte ergeben, da bei unvollständiger Hämolyse ein Teil des in den Blutkörperchen enthaltenen Zuckers auf dem Filter zurückbleiben würde. Nun ist diese Behauptung von vornherein unwahrscheinlich, da bei allen gebräuchlichen Enteiweißungsmethoden ja reichlich destilliertes Wasser zugeführt wird, welcher Vorgang eine vollkommene Hämolyse als höchst wahrscheinlich erscheinen läßt. Trotzdem haben wir die Angaben von *Schmidt* (die von *Etienne* und *Vérain* waren uns im Original nicht zugänglich) nachgeprüft, indem wir einmal den *Bertrand* in der gewöhnlichen Weise ausführten, das andere Mal genau nach den Angaben von *Schmidt* $^2/_3$ n Schwefelsäure zusetzten. In der folgenden Tabelle haben wir unsere Resultate zusammengestellt. Aus derselben geht hervor, daß wir erstens im Gesamtblute immer den gleichen Wert erhielten, gleichgültig, ob wir die Analyse nach *Bertrand* oder nach *Schmidt* durchführten, und zweitens, daß die Werte im Plasma immer etwas höher liegen als im Gesamtblute, daß also die Blutkörperchen immer etwas weniger Zucker enthalten als das Plasma. In einem Versuch machten wir zuerst mit Ammoniak alkalisch und neutralisierten dann mit Schwefelsäure. Auch in diesem Falle erhielten wir die gleichen Werte. Wir haben also keine Veranlassung, von den bewährten Methoden (*Bertrand*, *Weisz*sche Modifikation der *Bang*schen Methode usw.) abzugehen.

---

[1]) Diese Zeitschr. **150**, 492, 1924.

Gesamtblut				Plasma				
nach *Bertrand* mg-Proz.	nach *Schmidt* mg-Proz.	nach *Bang* hämolysiert mg-Proz.	nach *Bang* mg-Proz.	nach *Bertrand* mg-Proz.	nach *Schmidt* mg-Proz.	nach *Bang* mg-Proz.	Oxalat mg-Proz.	Bemerkungen
123,4 124,6	127,1 130,3	—	—	—	—	—	1	Patient nicht nüchtern
69,0 76,0	69,3 68,1	—	—	94,0	—	—	1	Patient nüchtern
94,3 104,5	97,3 101,1	108 108	102,1 105,4	111	—	124,5 124,5 122,8	1	Patient nicht nüchtern
89,1 85,4	81,2 79,3	— —	— —	103,7 101,3	— —	— —	1	Patient nüchtern
93,3 96,8	92,0 96,6	— —	— —	— —	121,0 125,0	— —	1	Patient nüchtern
114,7	121,0 125,0	— —	— —	— —	156,0 160,0	— —	1	Patient nüchtern
157	150 155	—	—	—	180,0	—	1	Patient nicht nüchtern
	104,8	—	—	—	142,6	—	—	Patient nüchtern
	103,0	—	—	—	136,1	—	—	
	94,0*)	—	—	—	—	—	—	
	92,0*)	—	—	—	—	—	—	

*) Blut wurde zuerst mit $^2/_3$ n NH_3 hämolysiert und hierauf mit $^2/_3$ n H_2SO_4 sauer gemacht. Dieses Blut wurde nach *Schmidt* weiter verarbeitet.

Als eine vollständige Verkennung der Situation müssen wir es aber bezeichnen, wenn *M. Richter-Quittner* den Grund hierfür, daß nach ihren früheren Analysen die Blutkörperchen immer zucker- und chlorfrei gefunden wurden, auch heute noch darin erblicken will, daß bei der Gewinnung des Plasmas die größte Mühe darauf verwendet wurde, die Körperchen nicht zu schädigen. Wie wir in unseren beiden Mitteilungen[1]) gezeigt haben, ist es ganz gleichgültig, welche gerinnungshemmende Mittel man verwendet, oder ob man ohne Zusatz eines gerinnungshemmenden Mittels arbeitet, indem man das Blut in paraffinierten Röhrchen auffängt und sofort zentrifugiert. In allen Fällen findet man immer eine gewisse und nicht unbeträchtliche Menge von Zucker in den Körperchen. Ebenso wie alle in unserem Laboratorium arbeitenden Kollegen sind wir davon überzeugt, daß die abweichenden Befunde *M. Richter-Quittners* nicht auf den besonderen biologischen Verhältnissen der Blutgewinnung, sondern auf der Unrichtigkeit ihrer Angaben beruhen. Für uns ist diese Angelegenheit hiermit abgetan und wir verzichten, nochmals darauf zurückzukommen.

[1]) Diese Zeitschr. **148**, **150**, 1924.

Über die Diastasebestimmung im Stuhle.

Von

Nikolaus Frank und Friedrich Doleschall.

(Aus der I. medizinischen Klinik der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 14. Dezember 1924.)

Für die funktionelle Pankreasdiagnostik bedeutete *Wohlgemuths* (1) Verfahren zur Diastasebestimmung einen großen Fortschritt. Auf ihre klinische Bedeutung weist die große Zahl der diesbezüglichen Mitteilungen; dieselben enthalten auch Bemerkungen über die Mängel der Methode, sowie Versuche zu ihrer Vervollkommnung. Der Nachweis der Diastase im Stuhle, Urin und Blute bietet der einfachen Methodik wegen trotz der kleineren und größeren Fehlerquellen für den Kliniker hinreichenden Einblick in die Produktion des Pankreassaftes, dessen Mangel bzw. sein Eindringen in den Darm.

Durch einen konkreten Fall angeregt, gelang es uns, solche Fehlerquellen der Diastasebestimmung aufzuklären, welche gerade in diagnostisch wichtigen Fällen einen Irrtum verursachen können. Bei einem ikterischen Kranken, wo Verdacht auf Tumor bestand, fanden wir folgende Diastasewerte: Im acholischen Stuhle 0; im Harn 10; im Blute 16. Die Diastasebestimmung im Duodenalsaft gab 2 Tage später 10,240 Einheiten. Da wir fanden, daß in acholischen Stühlen der Diastasenachweis oft negativ ausfällt, suchten wir den Grund für das Fehlen des im Duodenalsaft vorhandenen Ferments in einer Eigentümlichkeit des acholischen Stuhles.

Charakteristisch für die ikterischen Fäzes ist ihr Reichtum an Fetten, Fettsäuren und Seifen. Um zu entscheiden, ob einer der genannten Bestandteile das Fehlschlagen des Diastasenachweises verschuldet, versuchten wir die Entfernung der Seifen. Den Ausgangspunkt hierzu bildeten die Untersuchungen *S. Kendes* (2), der fand, daß der Nachweis von Diastase unmöglich ist, wenn sich in der Lösung neben Stärke auch Alkaliseifen der höheren Fettsäuren befinden.

Zu diesem Zwecke versetzten wir die zentrifugierte Fäzesemulsion mit $CaCl_2$ in der Voraussetzung, daß hierdurch die Alkaliseifen in nicht

lösliche Kalkseifen verwandelt werden, welche dann durch ein zweites Zentrifugieren entfernt werden können. Da jedoch das so bekommene Zentrifugat, auf Diastase untersucht, die Fähigkeit von Stärkeverdauung besitzt, haftet diesem Verfahren ein bedeutender Fermentverlust an. Ebenfalls nach den Untersuchungen von *Kende* kann die hemmende Substanz durch Ansäuerung gefällt werden; uns aber gelang nach Zusatz von n/10 HCl, Filtrieren und Neutralisieren selbst der Nachweis der ursprünglich vorhandenen Diastase nicht. Als diese Versuche das erwünschte Resultat nicht ergaben, probierten wir, den fraglichen hemmenden Bestandteil mittels Filtrieren der schon zentrifugierten Fäzesemulsion zu entfernen. Es ergab sich, daß Filtrieren in einem von sieben Fällen ein besseres Ergebnis zeitigte, zweimal die nachweisbare Fermentmenge unverändert blieb, viermal jedoch das Resultat verschlechterte.

Um Fett und fettähnliche Substanzen zu entfernen, behandelten wir die zentrifugierte Fäzesemulsion mit Äther. In über 40 Fällen verglichen wir den Diastasegehalt des nativen — mit Äther nicht behandelten — Stuhles mit dem des mit Äther extrahierten.

Das endgültige Verfahren gestaltete sich wie folgt:

Der Stuhl wird durch sorgfältiges Verreiben mit physiologischer Kochsalzlösung zu einer womöglich dünnen Emulsion verarbeitet. Die Emulsion wird zentrifugiert, vom Bodensatz abgegossen und mit gleicher Menge Äther etwa 3 Minuten energisch geschüttelt, dann durch abermaliges Zentrifugieren der Äther von der wässerigen Emulsion geschieden. Nach womöglich restloser Entfernung des Äthers und des sich beim Zentrifugieren regelmäßig bildenden gallertigen Ringes wird die Extraktion samt Zentrifugieren wiederholt. Die so bekommene Emulsion ist, mit der ursprünglichen verglichen, heller und durchscheinender. Die *Wohlgemuth*sche Reaktion stellten wir sodann mit der nativen und extrahierten Emulsion parallel ein.

Versuchsergebnisse.

Die Gläschenreihe mit der nicht extrahierten Stuhlemulsion enthielt nach dem 24 Stunden langen Stehen beinahe ohne Ausnahme einen Bodensatz. Dieser Bodensatz ist im ersten Gläschen in größter Menge vorhanden und verliert sich bei der meist zehnfachen Verdünnung, stufenweise immer weniger werdend, meistens in der Mitte der Gläschenreihe. Bei geringerer Verdünnung ist er weiter zu verfolgen, bei stärkerer verschwindet er früher; meistens sinkt er vollständig zu Boden, manchmal schwebt er als Trübung in der Flüssigkeit. Bei verschiedenen Stühlen mit gleicher Verdünnung ist die Menge nicht gleich: namentlich fettreiche Stühle liefern eine beträchtliche Menge.

Da die Quantität des Bodensatzes stets parallel mit der in den einzelnen Gläschen enthaltenen Fäzesemulsion ist, war der Hauptgrund seiner Entstehung in den Fäzes zu suchen. Mangelhaftes Zentrifugieren konnte ausgeschlossen werden, da die benutzte Fäzesemulsion allein keine oder nur ganz minimale Sedimentierung aufweist. Dieser Umstand weist auch darauf hin, daß der Bodensatz nicht nur aus Stuhlbestandteilen besteht, sondern auch mehr oder weniger Stärke enthält, was durch seine intensive Blaufärbung nach Jodzusatz zu beweisen war.

Die beim Ablesen des Versuchs auftauchenden Schwierigkeiten werden durch dieses Sediment verursacht. Während der Diastasegehalt von Urin und Blut stets leicht abgelesen werden kann, indem die ersten Gläschen eine blaßgelbe, die weiteren eine rote, lila und endlich dunkelblaue Färbung zeigen (Bodensatz gibt es keinen), stehen im Stuhle die Verhältnisse anders. Nur in den seltensten Fällen bekommt man hier eine Gelbfärbung; selbst in dem ersten Gläschen ist die Reaktion manchmal grünlich, das andere Mal grau, meistens hellblau. Die letzten Gläschen sind stets dunkelblau; oft ist in der Mitte ein rotes oder violettes Gläschen zu finden; manchmal ist die ganze Reihe dunkelblau. Meistens jedoch ist die Blaufärbung in der ersten und zweiten Hälfte der Reihe eine verschiedene: ihre Intensität nimmt nach der Mitte zu ab, um dann plötzlich in tiefes Dunkelblau überzugehen; größtenteils bildet den Übergang ein violettes oder rotes Gläschen. Selbst ein auf den ersten Blick paradoxes Verhalten kann beobachtet werden: nach blauen Gläschen mit abnehmender Intensität tritt gelbe Farbe auf, dann rot, lila und zum Schluß die obligaten dunkelblauen Gläschen.

Da die Intensität der in der ersten Hälfte der Gläschenreihe auftretenden Blaufärbung einen gewissen Parallelismus mit der Menge des dort zu findenden Bodensatzes zeigt, suchten wir den Zusammenhang zwischen den beiden Erscheinungen. Dies gelang durch folgende Beobachtung: wird der Inhalt der Gläschen durch Schütteln vermengt, bekommen wir immer Blaufärbung. Wenn die Sedimentierung vollkommen ist, kann man, von der klaren Flüssigkeit ein wenig abgießend, in ihr Stärke nicht nachweisen; wenn in solchem Falle das vorgeschriebene Auffüllen mit kaltem Wasser so vorsichtig geschieht, daß der Bodensatz dadurch nicht aufgewirbelt wird, ist das Herabsinken des hinzugefügten Jodtropfens genau zu verfolgen: er bleibt gelb, bis das Sediment nicht erreicht wird, dort tritt dann Blaufärbung ein. Auch *Starkenstein* (3) fand eine störende Bodensatzbildung, als er den Diastasegehalt der Leber mit der *Wohlgemuth*schen Methode untersuchte, und gibt der Meinung Ausdruck, daß der Bodensatz bei Beurteilung des Ergebnisses nicht vernachlässigt werden darf.

Hier möchten wir bemerken, daß auch eine nicht tadellose Stärkelösung Sedimentierung verursachen kann, welche jedoch in jedem Gläschen unabhängig von dem untersuchten Stoffe auftritt und auch bei Harn- und Blutdiastasebestimmungen zu finden ist. Die zurzeit als „Amylum solubile" käuflichen Präparate sind viel schwerer in gute — auch nach 24 Stunden kein Sediment gebende — Lösung zu bringen als das echte *Kahlbaum*sche. Zum Vermeiden dieser Fehlerquelle wendeten wir zur Bereitung der Stärkelösung folgendes Verfahren an: Die abgewogene Stärke wurde mit wenig kaltem Wasser verrieben, in siedendes Wasser gegossen und ungefähr 10 Minuten gekocht. Damit eine Sedimentbildung sicher vermieden wird, ist es ratsam, sich mit ½proz. Stärkelösungen zu begnügen, was dann bei der Berechnung selbstverständlich in Betracht zu ziehen ist.

Nach alledem ist es klar, daß die Blaufärbung in der ersten Hälfte der Gläschenreihe anders zu deuten ist als jene in den letzten Gläschen. Die letzteren enthalten nicht genügend Ferment, um alle Stärke abzubauen: die Diastasewirkung ist gleich 0. Auch den ersten Gläschen diese Erklärung zuzuschreiben, wäre falsch: hier vollzog sich eine Diastasewirkung, nur ist diese durch die blaue Reaktion der sedimentierten und der Diastasewirkung entzogenen Stärke verschleiert. Für diese Auffassung spricht auch der hier meist viel hellere Farbenton (es ist nur geringe Menge von Stärke vorhanden), sowie die Tatsache, daß die Intensität der Blaufärbung parallel mit dem Inhalt der einzelnen Gläschen an Fäzesemulsion, also auch an Diastase ist. Daß nach blauen Gläschen öfters noch Erythrodextrin, ja in dem oben paradox genannten Falle auch Achroodextrin zu finden ist, bekräftigt ebenfalls unsere Auffassung.

Am besten wird die Richtigkeit unserer Annahme durch das Verhalten des mit Äther behandelten Stuhles demonstriert. Im größten Teile dieser Fälle bildete sich überhaupt kein Bodensatz. Wenn selten dennoch eine Sedimentierung zu beobachten war, so blieb die Menge des Sediments weit hinter dem des gleichzeitig parallel eingestellten, nicht extrahierten Stuhles zurück. Jodzusatz ergab bei dem nach unserer Methode behandelten Stuhle die gleiche Reaktion, wie sie bei Diastasebestimmung im Urin oder Blutserum zu sein pflegt: in den ersten Gläschen Achroodextrin, darauf ein bis zwei Gläschen Erythrodextrin, zum Schluß die blaue Jodstärke; zwischen beiden letzteren kann das durch Mischung von Rot und Blau entstehende Violett auftreten. Gab es einen kleinen Bodensatz, so bekamen wir in dem ersten Gläschen statt reinen Gelbs einen blaßgrünlichen Farbenton.

Demnach besteht der Unterschied bei den meisten als normal anzusehenden Stühlen zwischen extrahierter und mit Äther nicht

behandelter Emulsion darin, daß erstere den typischen Verlauf der Reaktion zeigt, während sonst schon in den ersten Gläschen Jodstärke auftritt. Bei normalen Stühlen erreicht die Blaufärbung keine solche Intensität, welche das Ablesen des Resultats unmöglich machen würde. Fettreiche, viel Bodensatz gebende Stühle verhalten sich allerdings anders. Ohne Extraktion sind schon die ersten Gläschen so dunkelblau gefärbt, daß sie von den letzten, tatsächlich zu wenig Ferment enthaltenden, nicht zu unterscheiden sind. Daß in der Mitte öfters ein violett gefärbtes Gläschen zu finden ist, gibt keinen genügenden Anhaltspunkt zum Ablesen des Resultats; gelbe Gläschen nach vorangegangenen blauen sind gar so selten, daß darauf nicht zu rechnen ist. Es ergibt sich ein scheinbar negatives Resultat; der Grund hierfür liegt jedoch in der nicht entsprechenden Methodik, nach Ätherbehandlung nämlich gelingt es, Diastase nachzuweisen.

Nun seien noch in *Tabellenform* einige unserer Fälle angeführt, um zwischen den Eigentümlichkeiten der nativen und extrahierten Fäzesemulsionen einen Vergleich ziehen zu können. Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß im 24., 25. und 41. Falle das Ergebnis der Diastasebestimmung ohne Ätherbehandlung zweifelsohne negativ war, während es nach der Extraktion 80, 80 bzw. 440 diastatische Einheiten aufzuweisen gelang. Im 9., 21., 32., 42., 46. Versuch war das — die Grenze der Verdauung zeigende — Gläschen mit voller Bestimmtheit erst durch Extraktion zu erkennen, weil das Erythrodextrin enthaltende Gläschen zwischen den blaugefärbten sozusagen versteckt war. Die Tabelle zeigt außerdem, daß eine ganz beträchtliche Hemmung der Fermentwirkung auch ohne Ikterus, so z. B. im 46. Falle in scheinbar vollkommen normalem Stuhle auftreten kann. Der 30. und 37. Fall zeigt, daß unser Verfahren hier die Reaktion schöner, das Ablesen leichter gestaltete, jedoch das Resultat mit einem Gläschen hinter dem nativen Stuhle blieb. Es ist möglich, daß beim Extrahieren geringe Mengen von Ferment verloren gehen; bei der *Wohlgemuth*schen Reaktion aber, wo ja nur Differenzen von 100 Proz. abzulesen sind, verursacht dieser Verlust keine Limesverschiebung. Der 33. Versuch bestätigt die Beobachtung von *Bálint* und *Molnár* (6), daß das Stehenlassen 24 Stunden hindurch keine Fermentzerstörung verursacht, da uns hier nach 48 Stunden in faulendem Stuhle der Diastasenachweis noch gelang. Endlich möchten wir noch auf unsere Fälle Nr. 32, 43 und 47 hinweisen, in welchen die Fermentbestimmung trotz saurer Reaktion der Fäzes (gegenüber Lackmuspapier) durchzuführen war. Wahrscheinlich hindern die wenig dissoziierten organischen Säuren wegen ihrer niedrigen H-Ionenkonzentration die Fermentwirkung nicht, wogegen gut dissoziierte Mineralsäuren einen hemmenden Einfluß besitzen.

Über die Diastasebestimmung. *Frank-Doleschall.*

Versuchs-nummer	Diagnose	Ergebnis		Beschaffenheit der Fäzes	Bemerkungen
		ohne Ätherbehandlung	nach Ätherbehandlung		
9.	Lymphogranulomatosis.	1—4 ✘, 5 +, 6 ✘, 7 ×, 8—10 ✳	1—3 ○, 4—5 +, 6—7 ×, 8 *, 9—10 ✳, D = 640 ○	braun	Haut subikterisch
21.	Ikterus	2 ○, 3—4 ✘, 5—13 ✳	2—6 +, 7 ×, 8 ✳, D = 320 ○	gelb, Geruch säuerlich	Serumbilirubin 9,2 mg, im Sediment Fettsäurekristalle und Seifen
24.	Cc. pankreatis	1—10 ✳	1—4 ○, 5—10 ✳, D = 8 ○	acholisch, Geruch säuerl., Reaktion alkalisch	Nach Ätherbehandlung entsteht ein dicker Ring
25.	Diabetes mel.	1—10 ✳	1—3 +, 4 ×, 4—10 ✳, D = 8 ○	gelb, Geruch säuerlich	
30.	Sine morbo	2—5 ✘, 6 ○, 7 ×, 8—10 ✳	2—5 ○, 6 ×, 7—10 ✳, D = 92 ○	braun	2 mm dicker Ring
32.	Cirrhosis hepatis. . . .	1 ✘, 2—8 ✳	1—3 ○, 4—5 ×, 6—9 ✳, D = 36 ○	gelb, salbenartig, Geruch säuerl., Reaktion sauer	Serumbilirubin 2,4 mg, direkt. Reaktion positiv
33.	Tumor abdominis . . .	1—5 ✘, 6 ×, 7—9 ✳	1—5 ○, 6 ×, 7—10 ✳, D = 96 ○	faulig zersetzt	
37.	Bronchopneumonia. . .	1—6 ✘, 7 ×, 8—9 ✳	1—4 ○, 5—6 ×, 7—9 ✳, D = 100 ○	geformt	
41.	Lues hepatis.	1—10 ✳	1—3 ○, 4—5 ×, 6—10 ✳, D = 44 ○	gelb, geformt	Gelbsucht, Bilirubin im Urin positiv
42.	Tumor abdominis . . .	1 +, 2—4 ✘, 5 *, 6 ×, 7—10 ✳	1 ○, 2—4 +, 5—6 ×, 7—10 ✳, D = 72 ○	salbenartig, Reaktion neutral	
43.	Cc. pankreatis	1—3 ✘, 4 ×, 5—10 ✳	1—3 ○, 4 ×, 5—10 ✳, D = 14 ○	acholisch, Reaktion sauer	Alimentäre Glykosurie, im Urin Bilirubin positiv, Urobilin negativ
46.	Aneurysma aortae . . .	1—2 ✘, 3—4 *, 5—10 ✳	1—2 ○, 3 ×, 4 *, 5—10 ✳, D = 9 ○	gelb	Fleischlose Diät
47.	Ikterus	1—6 ✘, 8—10 ✳	1—4 ○, 5 ×, 6—10 ✳, D = 48 ✳	geformt, hellgelb, Reaktion sauer	

Zeichenerklärung: Gelb ○, grau +, hellblau ✘, blau ✳, rot ×, lila *.

Nach Überblickung unserer Versuchsergebnisse mußte die Frage aufgestellt werden, wie jene Tatsachen in Übereinstimmung zu bringen sind, daß nämlich Seifen auf die Diastasewirkung hemmend einwirken, andererseits jedoch Ätherbehandlung den hemmenden Einfluß aufheben kann? Die Antwort fanden wir in den Eigenschaften der Seifenlösungen, daß sie bei starker Verdünnung einer hydrolytischen Spaltung verfallen; es entstehen freie Fettsäuren und Alkalien. Die in Lösung befindlichen, nicht gespaltenen Seifenmoleküle treten mit der Fettsäurekomponente in eine komplexe Verbindung: es entstehen saure Alkalisalze der Fettsäuren. Diese sind es, die z. B. das Schäumen einer Seifenlösung verursachen. Wird die verdünnte Lösung einer Alkaliseife mit Äther geschüttelt und zentrifugiert, bekommen wir den bei der Fäzesextraktion regelmäßig beobachteten gallertigen Ring. Die Seifenlösung ist heller geworden und schäumt nicht mehr. Da die die Fermentverdauung hemmende Substanz mittels Äthers extrahierbar ist, durfte des analogen Verhaltens wegen vorausgesetzt werden, daß der die Stärkeverdauung hemmende Einfluß auf die im Stuhle vorhandenen bzw. bei der Verdünnung entstehenden sauren Alkalisalze der Fettsäuren zurückzuführen ist. Die Entstehung des Bodensatzes wäre so zu erklären, daß die sauren Alkalisalze der Fettsäuren mit der Stärke in Verbindung treten und binnen 24 Stunden zu Boden sinken. Dieser Tatsache entspricht auch das Verhalten der sauren Alkalisalze der Fettsäuren Ruß gegenüber [*Hollemann* (5)].

Der Einfluß der sauren Alkalisalze der Fettsäuren auf die diastatische Verdauung ist nachzuweisen dadurch, daß eine Lösung von Alkaliseife den Nachweis der Fermentverdauung unmöglich macht: es bildet sich ein reichlich Stärke enthaltender Bodensatz. Wird hingegen die Seifenlösung mit Äther ausgeschüttelt und dann der Ferment und Stärke enthaltenden Lösung zugefügt, kommt es zu keiner Sedimentierung, und das Verdauen der Stärke kann mittels der Jodprobe konstatiert werden. Nach alledem sind wir der Meinung, daß der hemmende Einfluß auf die Wirkung der Diastase nicht durch Fette, auch nicht durch Seifen als solche, sondern durch die sauren Alkalisalze der Fettsäuren verursacht wird.

Wichtigkeit aus differentialdiagnostischem Standpunkte besitzt unser Verfahren dort, wo bei mit Ikterus einhergehenden Lebererkrankungen nach der alten Methode im Stuhle Diastase nicht nachweisbar war, im Blute und Harn dagegen ungefähr normale Werte gefunden wurden. Dieser Befund zeigt scheinbar auf eine Hypofunktion des Pankreas. Hingegen bekommen wir nach Extraktion des Stuhles normale Diastasewerte als Zeichen dessen, daß durch die Erkrankung der Pankreas nicht in Mitleidenschaft gezogen ist.

Nach alledem ist unser Verfahren mit Erfolg anzuwenden bei jeder Diastasebestimmung im Stuhle, da durch Ausschalten störender Nebenerscheinungen das Ablesen des Resultats sich leichter und zuverlässiger gestaltet; nicht zu entbehren ist es jedoch bei Fettseifenstühlen (Pädiatrie), wo der Nachweis der Diastase bis jetzt oft falsche Resultate gab.

Literatur.

1) Methoden der Fermentuntersuchungen. Diese Zeitschr. **9**. — 2) Magyar Orvosi Archivum 1916. — 3) Diese Zeitschr. **24**, 1910. — 4) Berl. klin. Wochenschr. 1910. — 5) Lehrbuch der organischen Chemie, 13. Aufl., S. 94.

Untersuchungen über physiologische Gleichgewichtszustände bei Pflanzen. Über die Abhängigkeit der Wachstumskonstanten von Mais (Zea Mays L.) von der Höhe der Stickstoffernährung.

Von

August Rippel und **Oskar Ludwig.**

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 16. Dezember 1924.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Der Wachstumsverlauf aller Pflanzen zeigt, in ein Koordinatensystem eingetragen, mit der Zeit auf der Abszisse, dem Ertrag, der erreichten Länge oder Zellenzahl, der Größe des Umsatzes an Nahrung bzw. der Menge der entstandenen Stoffwechselprodukte usw. (also aller Lebenserscheinungen, die das fortschreitende Wachstum begleiten oder dieses selbst darstellen) auf der Ordinate die Gestalt einer S-förmig geschwungenen Kurve, deren Verlauf zuerst *Robertson*[1]) durch eine bei den weiter unten zu schildernden Untersuchungen benutzte Formel mathematisch zu erfassen suchte. Bezüglich weiterer Einzelheiten sei auf die zusammenfassende kritische Darstellung des einen von uns verwiesen[2]). Mit Rücksicht darauf sei hier nicht näher auf die Berechtigung der Anwendung dieser Formel für das Pflanzenwachstum eingegangen, zumal wir an ausgedehnterem Material auf diese Frage zurückkommen werden. Hier sei nur hervorgehoben, daß die Konstante dieser Formel, die *Wachstumskonstante* (s. *Rippel*), das Charakteristikum des betreffenden Wachstumsvorganges darstellt.

Es ergibt sich daraus die Frage: Ist diese Konstante für das Gesamtwachstum einer jeden Pflanzenart, für das Wachstum einzelner Organe, für die sonstigen das Wachstum begleitenden Vorgänge eine jeweils für den betreffenden Vorgang feststehende, unveränderliche Größe, oder ist sie je nach den äußeren Bedingungen, unter denen das

[1]) *Th. Br. Robertson*, Arch. f. Entwicklungsmechanik **25**, 581, 1907.

[2]) *A. Rippel*, Wachstumsgesetze bei höheren und niederen Pflanzen. Naturwissenschaft und Landwirtschaft, 1924, Heft 4. Herausgegeben von Boas. P. Datterer, Freising.

Wachstum usw. erfolgt, veränderlich? Wir werden im folgenden sehen, daß das letztere der Fall ist. Es ist klar, daß wir damit einen gewissen Einblick in das Ineinander- und Gegeneinanderwirken der verschiedenen, die betreffenden Vorgänge bedingenden Faktoren gewinnen können, eine Verschiebung des physiologischen Gleichgewichtszustandes der Wachstumsreaktion, wie man in Anlehnung an derartige der physikalischen Chemie geläufigen Vorstellungen sagen kann.

Die vorliegenden Versuche prüfen die Wirkung einer verschieden hohen Stickstoffernährung auf den Wachstumsverlauf des Mais, gemessen an dem jeweiligen Gesamtertrag. Sie sollen einen ersten Einblick in diese Verhältnisse gewähren, denen sich weitere Untersuchungen, insbesondere auch über die entsprechenden Vorgänge bei Mikroorganismen, anschließen sollen, bei denen, wie *Rippel* in der oben erwähnten Arbeit bereits betont hat, besonders komplizierte Verhältnisse vorliegen können, die aber wohl im Prinzip denselben Ursprung haben werden wie bei den höheren Pflanzen, was auch die unten S. 136 gemachten Ausführungen zeigen.

Die Versuche wurden in Zinkgefäßen angestellt, die innen mit einem Anstrich von Eisenlack versehen sind; jeder Topf erhielt 20 kg Sand (kalkhaltiger, stickstoffarmer Sand des Leinetales bei Göttingen mit einem Wasserfassungsvermögen von 27,3 Proz.). Beim Füllen wurde ½ Liter Wasser, nach dem Füllen 2 Liter Bodenaufguß (um genügend ammoniakoxydierende Bakterien hineinzubringen, da Ammoniumnitrat gegeben wurde) gegeben. Darauf sofort Einsaat am 5. Mai 1924, und zwar kleiner gelber Tiroler Cinquantinomais, bezogen von Haage und Schmidt in Erfurt, pro Topf 15 Körner. Leider war das Saatgut ganz außergewöhnlich schlecht, so daß die Keimung etwas unregelmäßig war. Bei dem Vereinzeln der Pflanzen auf je fünf pro Topf wurde diese Unregelmäßigkeit nach Möglichkeit ausgeglichen; doch war es trotzdem nicht zu vermeiden, daß hin und wieder ein Keimling verpflanzt werden mußte, da an wenigen Stellen alle drei Körner nicht gekeimt hatten. Diese verpflanzten Keimlinge wuchsen gut an und zeigten kein Zurückbleiben hinter den normalen.

Am 20. Mai wurde der Wassergehalt des Sandes auf 60 Proz. des Wasserfassungsvermögens erhöht. Später, als die Pflanzen größer wurden, erfolgte eine weitere Zulage von Wasser entsprechend dem Frischgewicht der Pflanzen bis Periode 4. Von Periode 5 an wurde keine weitere Wassergabe mehr zugelegt, was vielleicht nicht ganz richtig war, indes betragen die fehlenden Wassermengen nur etwa 500 ccm bei dem höchsten Gewicht, was bei einer Gesamtwassermenge von 3300 ccm und der schnellen Verdunstung kaum etwas ausmachen kann. Außerdem wurden ja nur die beiden letzten Reihen V und VI mit ihrer höheren Produktion davon betroffen; ihr Gewicht könnte also höchstens etwas zu niedrig ausgefallen sein. Die Ergebnisse werden also nicht davon berührt, da ohne weiteres ersichtlich ist, daß Reihe V und VI davon höchstens in einer für die erhaltenen Ergebnisse *ungünstigen* Richtung hätten beeinflußt werden können.

Die Töpfe wurden täglich einmal, an heißen Tagen zweimal begossen; durch Wiegen alle 2 bis 3 Tage wurde das Gewicht kontrolliert, wobei

sich diese Kontrolle als völlig genügend erwies, ein tägliches Wiegen also nicht notwendig war, was auch noch durch weitere Stichproben, vor allem nach dem Gießen ohne Wiegen, sichergestellt wurde. Das Gewicht schwankte dabei stets nur um ± 100 g.

Als Nährstoffe erhielt jeder Topf 6 g KH_2PO_4 und 4 g K_2SO_4 mit dem ½ Liter Wasser beim Füllen. Da der Wachstumsverlauf bei verschieden hoher Stickstoffernährung verfolgt werden sollte, wurde der als Ammoniumnitrat gegebene Stickstoff in folgender Weise abgestuft:

Reihe I . . . ohne Stickstoff
„ II . . . mit 0,3 g Amoniumnitrat pro Topf
„ III . . . „ 2,0 g „ „ „
„ IV . . . „ 2,0 g „ „ „
„ V . . . „ 3,5 g „ „ „
„ VI . . . „ 6,0 g „ „ „

Reihe III sollte eigentlich 1 g Ammoniumnitrat erhalten, bekam aber versehentlich ebensoviel wie Reihe IV, wie aus den Ertragszahlen in Tabelle I hervorgeht.

Tabelle I.

Datum der Ernte	25. V. 1924	7. VI. 1924	21. VI. 1924	1. VII. 1924	11. VII. 1924	24. VII. 1924	4. IX. 1924
Zeit in Tagen	12	25	39	49	59	72	113
Zeit in Perioden	1	2	3	4	5	6,23	9,5
Reihe I	0,46 ± 0,017	2,60 ± 0,22	5,95 ± 0,29	8,6 ± 0,94	11,8 ± 0,84	14,2 ± 0,38	16,5
„ II	0,59 ± 0,071	4,03 ± 0,31	9,18 ± 0,38	14,4 ± 0,84	22,0 ± 0,28	30,1 ± 1,70	27,6
„ III	0,90 ± 0,059	7,08 ± 0,28	30,33 ± 1,93	50,2 ± 0,41	67,8 ± 5,04	84,3 ± 2,67	91,3
„ IV	0,93 ± 0,072	7,70 + 0,39	29,10 ± 1,63	47,1 ± 1,67	68,8 ± 3,31	77,8 ± 5,68	84,4
„ V	0,95 ± 0,073	7,88 ± 0,84	31,18 ± 0,61	66,0 ± 7,21	106,2 ± 6,28	123,3 ± 3,82	143,8
„ VI	0,95 ± 0,059	7,33 ± 0,58	31,10 ± 2,03	70,4 ± 6,67	126,3 ± 6,28	175,4 ± 9,99	216,5

Einsaat 5. V. Aufgang 13. V.

Tabelle I enthält zunächst das jeweils zu den verschiedenen Vegetationsperioden erreichte Trockengewicht (absolut trocken), wobei nur die oberirdische Pflanzenmasse berücksichtigt ist. Da die Pflanzen und einzelne Töpfe, wie erwähnt, infolge des schlechten Saatgutes nicht schön ausgeglichen aussahen, so haben wir bei der Ernte darauf geachtet, stets einen Mittelwert zu nehmen, indem wir bei den jeweils vier Parallelen je einen guten, einen schlechten und zwei Töpfe mittleren Standes ernteten, womit am einfachsten und ohne allzu große Willkür derartige Unregelmäßigkeiten im Stande ausgeglichen, d. h. gleichmäßig verteilt werden können.

In dieser Tabelle I sind die Zeiten, zu denen die jeweilige Ernte vorgenommen wurde, einmal in Tagen, das andere Mal in Perioden angegeben. Der Verlauf des Wachstums kann nur dann richtig erfaßt werden, wenn während seiner ganzen Dauer konstante Bedingungen herrschen. Das ist offenbar bei Versuchen, bei denen die Töpfe im Freien stehen müssen, naturgemäß nicht möglich, wenn die Zeit einfach nach Tagen gezählt wird. *Mitscherlich*[1]) ist daher so vorgegangen, daß er das Wachstum selbst als Maßstab nahm und jede Periode so wählte, daß er beispielsweise bei der Erbse von der vollständigen Entwicklung des die erste Wickelranke tragenden Blattpaares bis zur vollständigen Entfaltung des vierten Blattpaares rechnete. Wir benutzten prinzipiell dasselbe Verfahren, als Indikatorpflanze jedoch Hafer. Jede Periode wurde gemessen von dem Augenblick an, in dem eben die Spitze des zweiten Blattes erschien, bis zu dem Erscheinen der Spitze des vierten Blattes. Allerdings zeigt eine Beobachtung der Pflanzen, daß dieser zweite Zeitpunkt auch bei gleichmäßigster Keimung und Gleichmäßigkeit des ersten Zeitpunktes bei den verschiedenen Individuen sehr abweicht; der Unterschied kann 1 bis 2 Tage betragen. Wir sind daher so vorgegangen, daß wir stets mindestens drei Pflanzen beobachteten und die Periode nach der mittleren Entwicklung wählten. Aber auch so war das Ergebnis nicht besonders befriedigend, wie weiter unten noch auszuführen sein wird. Die zur Beobachtung benutzten Haferpflänzchen standen stets zur Verfügung, da alle 2 Tage neue Haferkörner gelegt wurden; als Substrat dienten dazu Blumentöpfe mit Ackererde.

Bevor wir nun auf die Berechnung der Kurven eingehen, müssen wir noch auf folgenden Punkt aufmerksam machen: *Mitscherlich* hat die Forderung gestellt, es müsse von dem jeweiligen Ertrag die Aussaat abgezogen werden. Demgegenüber hat der eine von uns betont, daß dies nicht richtig sei, da in der ersten Zeit des Wachstums dann ein negativer Wert herauskommt, was selbstverständlich eine Unmöglichkeit ist. Das zeigt sich auch bei unseren Versuchen. Es wogen fünf Maiskörner 0,63 g oder Trockensubstanz (bei 12 Proz. Feuchtigkeit) 0,55 g gegen gefunden bei Periode 1: 0,46 $\pm$ 0,017 g, was also noch nach 12 Tagen ebenfalls einen negativen Erfolg ergibt und somit unmöglich ist.

Rippel hat (l. c.,) nun folgende Überlegung angestellt: Wenn überhaupt die Forderung nach einem Abzug gestellt wird, so kann nur so viel an Pflanzenmasse dafür in Betracht kommen, wie an oberirdischer Masse, die wir hier ja nur berücksichtigen, allein aus dem in den Samen aufgespeicherten Reservestoffmaterial ent-

[1]) *E. A. Mitscherlich*, Landw. Jahrb. **53**, 167, 1919.

stehen kann. Diese Menge läßt sich aber durch Kultur unter Lichtabschluß leicht ermitteln. Wir säten also Maiskörner in Vegetationsgefäße mit dem gleichen wie zu den Versuchen benutzten Sande und stellten Lichtabschluß durch Überstülpen eines leeren Topfes her. Nach einer Periode, ebenfalls, wie oben gesagt, am Hafer gemessen (21. Juli bis 3. August 1924), wurde die oberirdische Trockensubstanz bestimmt: 108 Pflanzen ergaben 3,6 g Trockensubstanz, also pro Topf mit fünf Pflanzen 0,17 g. Dieses Gewicht von 0,17 g wurde nunmehr zur Berechnung der Kurven von dem jeweiligen Ertrage abgezogen. Ob tatsächlich eine Berechtigung dazu vorliegt, soll später noch diskutiert werden. Weiter wie bis zum Abschluß der ersten Periode wurde das Wachstum dieser etiolierten Pflanzen nicht mehr verfolgt, weil einmal das Gewicht zu dieser schon weiter vorgeschrittenen Zeit nicht mehr ins Gewicht fällt und ferner die etiolierten Pflanzen bei Abschluß der ersten Periode bereits zu kränkeln beginnen.

Tabelle II zeigt nunmehr das Ergebnis dieser Berechnungen. Hierbei wurde von Reihen III und IV, die ja gleiche Stickstoffmengen erhielten, das Mittel genommen. Die Berechnung geschah also mittels der *Robertson*schen Kurve

$$\frac{1}{x - x_1} \log \frac{y}{A - y} = K,$$

wobei y den zur Zeit x erreichten Ertrag, A den Endertrag, x_1 diejenige Zeit bedeutet, zu der die Hälfte des Ertrages erreicht ist. Die Anpassung an die Formel zeigt sich in dem Verhalten der Konstanten K, deren jeweiliger Wert in der Tabelle II für jeden x/y-Wert angegeben ist. x_1 wurde durch Interpolation aus den beiden der Hälfte des Endertrages A benachbarten Werten bestimmt; da die Kurve an dieser Stelle *praktisch* eine gerade Linie darstellt, ist das ohne weiteres möglich.

Das Ergebnis hängt sehr von der Wahl des Endwertes A ab, der sich bei derartigen Versuchen ja nicht genau bestimmen läßt, sondern das Mittel aus vier hier nicht immer sonderlich übereinstimmenden Parallelen darstellt; über die Größe der Schwankung unterrichtet Tabelle I. Leider wurden bei der letzten Periode versehentlich die vier Parallelen zusammengeworfen; doch zeigen die übrigen Zahlen die ungefähre Größenordnung der Schwankungen.

Um nun jede Willkür auszuschalten, haben wir den tatsächlich gefundenen Endwert als A angenommen, also darauf verzichtet, dieses A zu verschieben, um eine bessere Anpassung zu ermöglichen, eine Verschiebung, die ja nach oben oder nach unten infolge der großen Schwankungen möglich wäre. Hierdurch glauben wir das Ergebnis einwandsfrei gesichert zu haben.

Tabelle II.

y	x = Vegetationsperioden	K	x = Tage	K
		Reihe I.		
0,29	1	0,593	12	0,0476
2,43	2	0,398	25	0,0315
5,78	3	0,290	39	0,0290
8,43	4	0,282	49	0,0282
11,63	5	0,358	59	0,0358
14,03	6,23	0,338	72	0,0327
A = 16,33	(7,8)	—	(96)	—
		Reihe II.		
0,42	1	0,558	12	0,0463
3,83	2	0,347	25	0,0322
9,03	3	0,320	39	0,0320
14,23	4	0,379	49	0,0379
21,83	5	0,389	59	0,0389
29,93	6,23	0,432	72	0,0410
A = 27,43				
angenommen 34,93	(8,86)	—	(106,6)	—
		Reihe III/IV.		
0,75	1	0,751	12	0,0599
7,23	2	0,595	25	0,0448
29,53	3	0,388	39	0,0388
48,43	4	0,378	49	0,0378
68,13	5	0,436	59	0,0436
80,83	6,23	0,433	72	0,0421
A = 87,73	(7,52)	—	(93,2)	—
		Reihe V.		
0,78	1	0,719	12	0,0588
7,73	2	0,579	25	0,0488
31,03	3	0,487	39	0,0487
65,83	4	0,490	49	0,0490
106,03	5	0,529	59	0,0529
123,13	6,23	0,374	72	0,0362
A = 143,63	(8,30)	—	(101,0)	—
		Reihe VI.		
0,78	1	0,663	12	0,0557
7,16	2	0,547	25	0,0476
30,93	3	0,460	39	0,0460
70,23	4	0,468	49	0,0468
126,13	5	0,456	59	0,0455
175,23	6,23	0,406	72	0,0389
A = 216,33	(9,36)	—	(111,6)	—

In dieser Tabelle II ist zunächst die Berechnung mit x = Vegetationsperioden durchgeführt, sodann mit x = Tagen. Die Konstanten zeigen z. B. in Reihe V (weniger in Reihe VI) einen sehr starken Abfall bei dem letzten x. Durch niedrigere Wahl von A könnte dies aus-

geglichen werden; es sollen jedoch, gemäß dem eben Gesagten, nur die Originalzahlen Beürcksichtigung finden. Da wir bei niedrigerem A zu höheren Konstanten kämen, so rechnen wir also für das unten folgende Ergebnis ungünstig, was ebenfalls die Beweiskraft erhöht.

Bei Reihe II ferner war der Endwert niedriger als der vorhergehende Wert, was bei derartigen Versuchen leicht vorkommen kann. Hat man z. B. eine Schwankung von 8 Proz., so kann gegen Ende des Wachstumsverlaufes dieser Fall eintreten, da die Trockensubstanz prozentual nur mehr sehr wenig zunimmt. Am Anfang dagegen, bei großer prozentualer Steigerung, verschwinden derartige Fehler in der intensiven Substanzzunahme. Wir haben, um auf diese Reihe nicht zu verzichten, A so angenommen, daß es im Vergleich zu der vorhergehenden Periode etwa die gleiche prozentige Steigerung zeigte wie in den anderen Reihen, und zwar 15 Proz.; also 29,93 + 15 Proz. (= 5 g) = 34,93. Durch eine noch etwas höhere Wahl von A hätte auch hier eine noch bessere Anpassung (unter Erniedrigung der Konstanten) erzielt werden können; wir wollen aber auch hier mit diesem für unsere Schlußfolgerungen ungünstigen Fall rechnen.

Was nun bei Vergleich der beiden Berechnungsarten (x = Vegetationsperioden bzw. Tagen) auffällt, ist, daß bei beiden die erste Konstante viel zu hoch ausfällt, während die übrigen eine leidliche Übereinstimmung zeigen; jedoch fällt bei x = Vegetationsperioden auch noch die zweite Konstante zu hoch aus. Das müßte also besagen, daß in unserem Falle die Berechnung nach Tagen ein besseres Bild gibt als die Berechnung nach Vegetationsperioden, wie sie oben definiert wurden; was darauf hindeuten könnte, daß diese letztgenannte Messung der Zeit doch nicht ganz zutreffend ist. Wir würden somit hier feststellen, daß die Haferperioden in den beiden ersten Stadien des Maiswachstums zu kurz ausgefallen sind gegenüber der Zählung nach Tagen, was eben, wie man sich leicht durch Ausrechnen klarmachen kann, zu einer zu hohen Konstantenzahl führen muß. Es ist nun sehr leicht möglich — und nach dem Vorliegenden wahrscheinlich —, daß eben Hafer an etwas niederere Temperaturen angepaßt ist wie Mais, weshalb eben die Haferperioden beim jungen Mais bei noch etwas niederer Temperatur zu kurz ausfallen müssen. Auch kommt noch hinzu, daß sich Unterschiede besonders in der ersten Zeit des Wachstums mit großer prozentiger Steigerung bemerkbar machen werden (s. oben). Es wäre natürlich besser gewesen, die Perioden durch Mais selbst zu messen. Jedenfalls aber bedarf dieser Punkt bei künftigen Versuchen eingehender Berücksichtigung.

Selbstverständlich konnte auch die oben S. 136 erwähnte Unregelmäßigkeit in dem Wachstum des Hafers Schuld an dieser Erscheinung sein.

Es sei noch darauf aufmerksam gemacht, daß bei Zählung nach Tagen die Perioden fast gleich sind, von den beiden ersten Gliedern abgesehen. Denn es entspricht

Periode . . .	1	2	3	4	5	6,23
Differenz . .	1	1	1	1	1,23	
Tage	12	25	39	49	59	72
Differenz . .	1,30	1,40	1	1	1,30	

Der Verlauf des Wachstums wird also gar nicht sehr erheblich während der Vegetationsperiode von den äußeren klimatischen Faktoren beeinflußt, weshalb man auch, worauf wir schon an anderer Stelle[1]) hingewiesen haben, z. B. bei Gerste für die verschiedensten Jahre und Versuchsansteller nicht wesentlich verschiedene Konstanten findet; natürlich spricht das auch, gemäß dem weiter unten Gesagten, für eine ziemlich gleichartige Ernährung. Wir stellten dort fest:

Freilandversuche Breslau 1918	0,0490
„ „ 1919	0,0462
„ „ 1920	0,0404
Gefäßversuche *Scholz*	0,0413
Freilandversuche „	0,0483

Aus den oben in Tabelle II angegebenen Konstanten berechnen wir nun das Mittel, wobei aber der erste Wert weggelassen sei; wir kommen gleich darauf noch zurück. Es ergeben sich die in Tabelle III

Tabelle III.

Reihe	x = Vegetationsperioden K	x = Tage K	Schwankung Proz.
I	0,0260 ± 0,001 30	0,0301 ± 0,000 95	3,1
II	0,0330 ± 0,001 23	0,0388 ± 0,001 59	4,1
III/IV	0,0335 ± 0,001 95	0,0386 ± 0,001 00[2])	2,6
V	0,0408 ± 0,001 80	0,0476 ± 0,001 93	4,1
VI	0,0438 ± 0,001 30	0,0502 ± 0,001 16	2,3

wiedergegebenen Zahlen, wobei das Mittel für beide x ausgerechnet ist; man sieht, daß die Ergebnisse nur wenig abweichen. Der Mittelwert ist natürlich mit einer ziemlich großen Schwankung behaftet, wie die Prozentzahlen für das K bei x = Tagen zeigen. Doch liegen die Differenzen außerhalb der wahrscheinlichen (nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz berechneten) Schwankungen, außer, wenn zwei Werte zu nahe aneinander liegen. Für die beiden extremen Werte ergibt sich z. B. die Differenz 0,0201 ± 0,00149, so daß hier die wahr-

[1]) *Th. Pfeiffer* und *A. Rippel*, Journ. f. Landw. 1921, S. 137.

[2]) Die Einzelberechnung der Konstanten von III und IV ergab im Mittel (mit Ausnahme der ersten Konstanten) 0,0388 bzw. 0,0398, also genau denselben Wert, wiederum ein Beispiel dafür, daß es sich bei allen diesen Zahlen um keine Zufallsergebnisse handelt.

scheinliche Schwankung das 13,5fache der Differenz beträgt. Außerdem steigen die Konstanten allmählich an mit steigender Höhe der Stickstoffzufuhr. Allerdings fällt die Konstante der Reihe II insofern etwas aus dem Rahmen heraus, als sie gleich der von Reihe III/IV ist; wir hatten jedoch oben gesehen, daß innerhalb dieser Reihe (Tabelle II) die Konstanten stetig nach dem Endwert zu ansteigen, so daß A hier wohl noch etwas höher angenommen werden könnte, wodurch die Konstanten kleiner werden und somit zwischen denen von Reihe I und Reihe III/IV liegen müssen. Wir haben jedoch auch hier, um jeden Schein der Willkür zu vermeiden, unsere ursprüngliche Annahme stehenlassen.

Bevor wir uns nun mit dem Sinn dieser Verschiedenheit der Konstanten beschäftigen, müssen wir noch die erste Konstante jeder Reihe betrachten, die ja stets viel zu hoch ausgefallen ist (s. dazu Tabelle IV). Nun hat der eine von uns[1]) bereits darauf hingewiesen, daß die *Robertson*sche Formel den Wachstumsverlauf nicht ganz richtig wiedergibt, wenn K sehr klein wird; es wird betreffs näherer Angaben auf die zitierte Stelle verwiesen. Man kann diesen Fehler durch Subtraktion des Ausdrucks $\frac{x - x_1}{x_1} (A - A_1)$ von den experimentell gefundenen Zahlen ausgleichen, wie es in der mittleren Reihe der Tabelle IV geschehen ist. Man sieht, daß sich die Werte jetzt dem Mittel der übrigen Konstanten nähern, aber bei allen Reihen noch etwas zu hoch sind. Es müßten die y-Werte für die erste Periode noch höher sein, damit die erste Konstante dem Mittel der übrigen sich weiter näherte.

Tabelle IV.

Reihe	I	II	III/IV	V	VI
Konstante des 1. Wertes unkorrigiert	0,0470	0,0494	0,0558	0,0594	0,0622
„ „ 1. „ korrigiert .	0,0367	0,0432	0,0474	0,0541	0,0565
Mittel der übrigen Konstanten . . .	0,0301	0,0388	0,0386	0,0476	0,0502

Nun haben wir von unseren experimentellen Zahlen noch die oberirdische Trockensubstanz der etiolierten Pflanzen mit je 0,17 g abgezogen. Würde man das unterlassen, so würde eine weitere Annäherung erzielt. Es soll jedoch darauf verzichtet werden, diese Beobachtungen hier weiter zu diskutieren, da hierzu erst größeres und besseres Material vorliegen muß. Wir denken bei späteren Untersuchungen darauf zurückzukommen.

Im Anschluß an die vorstehenden Ausführungen muß noch auf einen Punkt aufmerksam gemacht werden: Wie Tabelle II ausweist, sind die Endzeiten unserer Kurven, also die Zeiten des Maximal-

[1]) l. c.

ertrages, sehr verschieden. Diese Verschiedenheit rührt daher, daß diese Endzeiten nach der Zeit des halben Maximalertrages (also x_1, gemäß der Definition in der *Robertson*schen Formel) angenommen wurden. Da wir in den vorliegenden Versuchen, wie eingangs erwähnt, mit großen Versuchsfehlern zu kämpfen haben, so läßt sich nicht ohne weiteres sagen, ob diese Verschiedenheit daher rührt oder im Wesen der Kurven begründet ist.

Dieses letztere ist allerdings kaum anzunehmen, da die Verschiedenheit der Endzeiten keine Regelmäßigkeit zeigt, sondern offenbar rein zufällig schwankt, während ja die Konstanten eine strenge Regelmäßigkeit (Steigen mit höherer Stickstoffzufuhr) erkennen lassen. So ist die Konstante bei Reihe I außerhalb der dreifachen wahrscheinlichen Schwankung, wie man aus Tabelle III ohne weiteres sieht, kleiner als in Reihe III/IV, die Endzeit bei Reihe I größer. Das Umgekehrte (kleinere Konstante bei kleinerer Endzeit) ist beim Vergleich von Reihe III/IV mit Reihe V der Fall. Woraus sich mit aller Deutlichkeit ergibt, daß die Konstanten nicht wesentlich von der geschilderten Erscheinung berührt werden.

Auch mit der tatsächlich beobachteten Länge der Vegetationszeit stehen unsere angenommenen Werte nicht in passendem Zusammenhang. Die Endzeit ist in Reihe I für Tage zu 96 berechnet, in Reihe VI zu 111,6, während die Beobachtung zeigte, daß umgekehrt das Wachstum der Reihe VI früher abgeschlossen war, die Pflanzen früher abgestorben waren als in Reihe I (eine Beobachtung, die übrigens gar nicht mit der sonst als feststehend angenommenen Verlängerung des vegetativen Wachstums durch hohe Stickstoffzufuhr übereinstimmt).

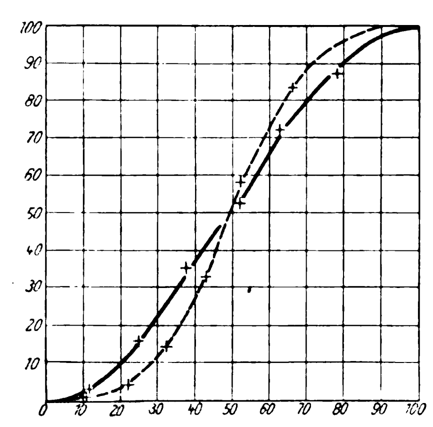


Abb. 1. Ertrag bei 0 g (ausgezogen) und bei 6 g Ammoniumnitrat (gestrichelt) in Prozenten des Höchstbetrages und der Maximalzeit (Ertrag auf Ordinate, Zeit auf Abszisse).

Es ist jedoch nach dem Gesagten nicht anders möglich, als diese Verschiedenheit der Endzeiten einstweilen als durch die unvermeidlichen Versuchsfehler bedingt hinzunehmen.

Wir wenden uns also zu der Frage, welches der physiologische Sinn des geschilderten Verhaltens der Konstanten, des Steigens bei steigender Stickstoffzufuhr, ist (Abb. 1). Um die Mittelkonstante zu berechnen, haben wir die Zeit auf gleichen Nenner gebracht, indem x für $y = A$ gleich 100 gesetzt wurde. Für die Formel braucht das

mit dem Ertrage y nicht durchgeführt zu werden, da der Ausdruck $\frac{y}{A-y}$ schon diesen relativen Wert darstellt. Für die graphische Darstellung dagegen muß die Umrechnung selbstverständlich durchgeführt werden, indem $A = 100$ gesetzt wird. Abb. 1 gibt so den Verlauf des Wachstums in Reihe I (ausgezogene) und Reihe VI (gestrichelte Kurve) wieder, und zwar nach den experimentell gefundenen x- und y-Werten; nur x für $y = A$ mußte natürlich nach den Zahlen in Tabelle II angenommen werden. Die Endwerte von x und y sind natürlich $= 100$ gesetzt.

Man sieht, daß die Kurve der höchsten Stickstoffreihe tiefer ausgebuchtet ist als die der niedrigsten Stickstoffreihe. Die übrigen liegen dazwischen, sind aber nicht mit gezeichnet, da sie sich zu sehr aneinanderdrängen und ein Zeichnen kaum möglich machen würden. Die Konstanten drücken diese Tatsache so aus, daß die Kurve um so tiefer ausgebuchtet ist, je höher die Konstante ist (natürlich bezogen auf relative x- und y-Werte, da sonst ein Vergleich ja nicht möglich wäre). In Zahlen bedeutet das, wie Tabelle V noch zeigen möge, daß unterhalb des Umkehrpunktes der Kurve ($A/2$, x_1) der prozentische Trockensubstanzertrag zu einem bestimmten Zeitpunkt bei höherer Konstante geringer ist als bei niederer, während oberhalb des Umkehrpunktes sich diese Verhältnisse umdrehen.

Tabelle V.

	Reihe I.					
Zeit*)	12,5	26,0	40,6	51,0	61,5	75,0
Ertrag	1,8	14,9	35,4	51,6	71,2	86,0
	Reihe VI.					
Zeit*)	10,8	22,4	35,0	43,9	52,9	64,5
Ertrag	0,4	3,3	14,3	32,5	58,3	81,0

*) Tage mit dem in Tabelle II stehenden Endwert.

Diese verschiedene Krümmung der Kurve bzw. die Veränderlichkeit der Konstanten zeigt uns nun einen veränderten Gleichgewichtszustand der Wachstumsreaktion an. Diese Reaktion setzt sich zusammen aus fördernden und hemmenden Momenten (es sei bezüglich ausführlicherer Darstellung auf *Rippel* verwiesen). Demgemäß wäre also anzunehmen, daß dieser veränderte Gleichgewichtszustand der Ausdruck einer Verschiebung zwischen den fördernden und hemmenden Faktoren während des Wachstumsverlaufes ist; wir wollen daher versuchen, unsere Kurven von diesem Gesichtspunkte aus zu betrachten.

Wären bei der verschieden hohen Stickstoffernährung die Konstanten gleich, so wäre also die zu gleichen Zeiten erreichte Trockensubstanzproduktion ebenfalls gleich. Man kann nun den jeweils zu einer bestimmten Zeit erreichten Gleichgewichtszustand, d. h. die

Höhe der Trockensubstanzproduktion, unter dem Einfluß variabler Mengen eines Nährstoffaktors vermittelst der von *Mitscherlich* angebenen Formel $\frac{1}{x} \log \frac{A}{A-y} = K$ ausdrücken (auch hierüber sei auf *Rippel* verwiesen, welche Anschauung sich nicht mit der *Mitscherlichs* deckt), worin x die variable Menge des Nährstoffs mit dem zugehörigen Ertrage y, A den Höchstwert bedeuten. Wir nennen K die Ertragskonstante im Gegensatz zur Wachstumskonstanten. Mit dieser Formel läßt sich also in unserem Falle die Abhängigkeit des Ertrages von der Höhe der Stickstoffernährung zu jedem gegebenen Zeitpunkt ausdrücken.

Wären nun die Wachstumskonstanten unserer Kurven gleich, so müßten, wie man ohne weiteres sieht, auch die Ertragskonstanten der jeweiligen Zeitquerschnitte untereinander gleich sein, da dann ja alle Wachstumskurven — bei prozentiger Umrechnung — in eine einzige zusammenfallen. Das ist aber nicht der Fall; auch die Ertragskonstanten sind während der einzelnen Wachstumsperioden verschieden. Tabelle VI zeigt zunächst an einem konstruierten Beispiel, wie der prozentische Umsatz für verschiedene Ertragskonstanten ist:

Tabelle VI.

x	y für $K = 0{,}05$	y für $K = 0{,}10$	y für $K = 0{,}20$	Formel
1	10,9	20,6	36,9	$\frac{1}{x} \log \frac{100}{100-y} = K$
5	43,8	68,4	90,0	
10	68,4	90,0	99,0	

Tabelle VII.

x = g Ammoniumnitrat	y bei Periode 1	2	3	4	5	6,23	9,5
0	37,2	34,0	18,7	12,0	9,2	8,0	7,5
0,3	53,9	53,5	29,2	20,3	17,3	17,0	(12,7)*)
2,0	96,2	101,0	95,5	68,9	54,0	46,1	40,5
3,5	100,0	108,0	100,3	93,7	84,1	70,3	66,4
6,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

*) Angenommene Zahl.

Tabelle VIII.

0,4	0,505	0,451	0,225	0,139	0,105	0,091	0,085
0,7	0,480	0,475	0,214	0,141	0,118	0,117	—
2,4	0,592	—	0,561	0,211	0,140	0,112	0,094
3,9	—	—	—	0,308	0,205	0,135	0,147

Wir sehen also, daß bei der Ertragskonstanten die prozentige Trockensubstanzerzeugung für die Nährstoffmenge x um so geringer ist, je kleiner die Ertragskonstante ist. Demgegenüber seien in Tabelle VII die prozentigen Ertragszahlen unseres Versuchs zu den

jeweiligen Zeitabschnitten gestellt. Man sieht beim Vergleich von Tabellen VI und VII ohne weiteres, daß bei unseren Versuchen die Ertragskonstante mit zunehmendem Alter der Pflanzen abnehmen muß; die prozentige Trockensubstanzerzeugung für eine gegebene Nährstoffmenge (hier Stickstoff) ist dann immer geringer. An der Gesetzmäßigkeit in dem Verhalten dieser Zahlen zeigt sich das mit wünschenswerter Deutlichkeit. Schließlich sind in Tabelle VIII noch die Ertragskonstanten für jede Wachstumsperiode angegeben, die nach der obigen *Mitscherlich*schen Formel berechnet wurden. Auch hier wurde darauf verzichtet, eine Verschiebung von *A* zur Erzielung einer besseren Anpassung vorzunehmen, um jede Willkür auszuschalten. Für die Stickstoffgabe 0 wurden 0,4 g Ammoniumnitrat eingesetzt. Diese Zahlen decken sich völlig mit dem, was aus den Zahlen der Tabelle VII zu entnehmen ist: Die Ertragskonstante sinkt mit zunehmendem Alter.

Mit zunehmendem Alter sind also immer größere Nährstoffmengen zur Erzielung einer *relativ* gleichen Trockensubstanz notwendig; oder, wenn wir den Begriff der Nährstoffeinheit nach *Baule* (auch hier sei im übrigen auf *Rippel* verwiesen) wählen: Die Nährstoffeinheit wird mit zunehmendem Alter der Pflanzen größer.

Sie beträgt bei Periode	1	2	3	4	5	6,23	9,5
in angenäherten runden Zahlen	0,3	0,3	1,0	1,5	1,8	2,2	2,5 g Ammoniumnitrat

Wenn nun aber die Nährstoffeinheit in den ersten Perioden des Wachstums so viel geringer ist als später, so kann das nichts anderes bedeuten, als daß eben zu dieser Zeit die Hemmung durch die steigende Stickstoffkonzentration bedeutend erheblicher sein muß als später, bzw. die Förderung geringer; denn auch die Ertragskurve erscheint ja als die Resultante einer Förderung und Hemmung. Diese Hemmung wird später also offenbar bis zu einem gewissen Grade überwunden, wie man daraus ersieht, daß zwischen Periode 2 und 3 ein Abfall in der prozentigen Trockensubstanzproduktion einsetzt (in Tabelle VII jeweils durch Querstriche kenntlich gemacht), der bis zwischen Periode 5 und 6,23 dauert. Später wird dieser Abfall wieder geringer, so daß offenbar hier wieder die Hemmung über die während der mittleren Vegetationszeit vorherrschende Förderung die Oberhand gewinnt. Die Ertragskonstante muß hier zwar noch sinken, wie die Zahlen ohne weiteres zeigen, aber nicht mehr in gleichem Maße wie vom Beginn zur Mitte.

Man kann sich nun die geschilderten Verhältnisse am einfachsten so vorstellen, daß in den ersten Perioden des Wachstums die größere Hemmung bei größeren Stickstoffmengen dadurch zustande kommt, daß die Pflanze die großen Mengen des gebotenen Nährstoffes nicht zu verarbeiten vermag; ob hierbei die relative Häufung von Stoff-

wechselprodukten eine Rolle spielt oder unter Umständen andere Ursachen (s. *Rippel*), kann hier nicht entschieden werden. Gleichwohl bieten aber die großen Nährstoffmengen der Pflanze genügend Material zu einer *absolut* größeren Trockensubstanzproduktion. Im weiteren Verlaufe rückt die Hemmung, wie wir aus Tabellen VII und VIII gesehen hatten, immer weiter nach den höheren Stickstoffkonzentrationen: Die Pflanze ist durch ihr Wachstum offenbar imstande, die schädlichen Einflüsse steigender Konzentration gewissermaßen zu verdünnen. Gegen Ende der Vegetationszeit wird diese Möglichkeit des Entwachsens aus dem schädlichen Einfluß der stärkeren Konzentration wieder geringer, vielleicht unter dem Einfluß dieser Konzentration selber. So treten also die Hemmungsmomente hier wieder stärker hervor.

Wenden wir uns nun von dieser Betrachtung der Ertragshöhe in ihrer Abhängigkeit von der steigenden Stickstoffzufuhr in den einzelnen Zeitabschnitten wieder zur Wachstumskurve, so treten die geschilderten Verhältnisse dort ebenfalls hervor: Wir sehen eben die Anfangs- und Endhemmung bei höheren Stickstoffgaben in der tieferen Ausbuchtung der Kurve und in dem Steigen der Konstanten sich ausdrücken.

Es sei hier noch erwähnt, daß bei der Hefevermehrung in Würze nach *Carlson* ebenfalls die gleiche Erscheinung zu beobachten war beim Vergleich normal wachsender Hefe mit solcher, die in Nährlösung sich vermehrte, der von vornherein Alkohol zugesetzt war. Es ergab sich dort (*Rippel*, l. c.):

Hefe in Stickstoffatmosphäre . . . K =	0,0239
„ normal in Luft	0,0279
„ mit 1,5 proz. Alkohol	0,0290
„ „ 6,0 „ „	0,0336

Dieses Beispiel zeigt ferner, daß das geschilderte Verhalten der Konstanten von der Höhe des Endwertes unabhängig ist. Während nämlich bei den vorliegenden Versuchen die Konstante mit *zu*nehmender (absoluter) Höhe von A steigt, steigt sie bei diesen Hefeversuchen mit *ab*nehmender (absoluter) Höhe von A.

Ferner sei erwähnt, daß nach den Versuchen von Fräulein *Meller*[1]) über das Wachstum von Bacillus (Proteus) vulgaris in Nährlösungen, in denen dieser Organismus schon einmal gewachsen war, ebenfalls diese Hemmung auftrat: Die Kurve des Wachstums ist auch hier, bei Verwendung der relativen Werte, tiefer ausgebuchtet als bei Wachstum in normaler Nährlösung. Es konnte hier wahrscheinlich gemacht werden, daß das Gegenspiel Protease — Antiprotease eine der Ursachen hierfür ist. Nach Behandeln einer solchen Nährlösung im Autoklaven verschwand der Unterschied gegen normal.

[1]) *R. Meller*, Centralbl. f. Bakt. II (im Erscheinen).

Es gilt also offenbar ganz allgemein, daß unter der Einwirkung derartiger Faktoren, wie in den drei erwähnten Fällen, also aller in den Stoffwechsel eingreifender bzw. dabei entstehender Faktoren, das physiologische Gleichgewicht gestört ist; und es ist sehr wahrscheinlich, daß irgendwelche Stoffwechselprodukte hierbei eine entscheidende Rolle spielen, wie besonders in dem von *Meller* beschriebenen Falle wahrscheinlich gemacht werden konnte. Weiter wollen wir jedoch diese Zusammenhänge hier nicht verfolgen, da erst größeres Material einen genaueren Einblick wird gewähren können und insbesondere bei Mikroorganismen die Verhältnisse unter Umständen besonders kompliziert sind.

Es sei hier endlich noch kurz darauf hingewiesen, daß auch bei Enzymreaktionen [man vgl. *Fodor*[1])] sich die Geschwindigkeitskonstante mit zunehmender Substratkonzentration ändert: Die prozentigen Umsätze sinken. Es mag jedoch unterbleiben, hier schon die offenbar bestehenden Zusammenhänge mit dieser Erscheinung klarzulegen.

Zusammenfassung.

Es wurde der Verlauf des Wachstums von Mais bei verschiedener Höhe der Stickstoffernährung verfolgt an der Hand der von *Robertson* aufgestellten Wachstumsformel mit den von *Rippel* angegebenen Erweiterungen. Die mit relativen Werten (Endwert und die zugehörige Zeit = 100) verglichenen Kurven zeigen eine um so intensivere Krümmung, je höher die Stickstoffernährung ist: Die Wachstumskonstante steigt mit steigender Höhe der Stickstoffzufuhr. Das ist offenbar eine Folge der Verschiebung des physiologischen Gleichgewichtszustandes der Pflanze, indem in dem aus Förderung und Hemmung aufgebauten System die Hemmungen bei höherer Stickstoffzufuhr *relativ* überwiegen.

Das zeigt sich auch darin, daß der bei verschieden hoher Stickstoffernährung zu entsprechenden Zeiten erreichte Ertrag relativ sehr verschieden ist. Dieser Wert nimmt mit fortschreitender Vegetationszeit ab, die Nährstoffeinheit (nach *Baule*) wird größer. Nach der *Mitscherlich*schen Ertragskurve sinkt die Ertragskonstante des Stickstoffs mit zunehmendem Alter. Auch dies ist eine Widerlegung der *Mitscherlich*schen Auffassung der Unveränderlichkeit der Ertragskonstanten für jeden Wachstumsfaktor, welche im Gegenteil eine fluktuierende Größe darstellt und daher nur eine Verwertung in dem von *Rippel* angedeuteten Sinne gestattet.

[1]) *A. Fodor*, Das Fermentproblem. S. 108 ff. Dresden, Th. Steinkopff, 1922.

Der Verwendungsstoffwechsel säurefester Bakterien.

IV. Mitteilung:

Der Verwendungsstoffwechsel der Tuberkelbazillen des Typus humanus und Typus bovinus.

Von

Seigo Kondo (Kanazawa).

(Aus der bakteriologisch-hygienischen Abteilung des städtischen Hygienischen Universitätsinstituts in Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 17. Dezember 1924.)

Die Arbeit von *Proskauer* und *Beck*[1]) aus dem Jahre 1894, „Beiträge zur Ernährungsphysiologie des Tuberkelbazillus", ausgeführt unter der Leitung von *Robert Koch*, bildet die feste Grundlage jeder Arbeit auf diesem Gebiete. Die Autoren zeigten in ihren mustergültigen Untersuchungen, daß der Tuberkelbazillus auf außerordentlich einfachen Nährböden zu wachsen vermag.

Ihre Untersuchungen sind in erfolgreicher Weise von *Lockemann*[2]) fortgesetzt worden, dem wir Arbeiten, welche vor allem die quantitative Seite des Stoffwechsels des Tuberkelbazillus betreffen, verdanken.

In den letzten Jahren sind von *E. Long*[3]) einige interessante Mitteilungen über den Verwendungsstoffwechsel säurefester Bakterien veröffentlicht worden, die wir schon in unseren früheren Mitteilungen mehrfach erwähnt hatten. Seine Methodik ist aber eine andere und die Resultate decken sich daher nicht immer mit den unsrigen. Er arbeitet z. B. mit festen Nährböden und verzichtet auf Passagen.

---

[1]) Beiträge zur Ernährungsphysiologie des Tuberkelbazillus. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **18**, 1894.

[2]) Beiträge zur Biologie der Tuberkelbazillen. Veröffentlichungen der Robert-Koch-Stiftung usw. 1918 und 1921; Deutsch. med. Wochenschr. 1913, 1918 und 1919; Zur Chemie des Tuberkulins. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 1911.

[3]) The Nutrition of acid-fast Bacteria. The American Review of Tuberculosis **5**, 1922. Chemical Evidence on the Phylogenetic classification of the tubercel bacillus **8**, 1923. The Chemistry of tuberculosis. Baltimore 1923.

In der vorliegenden Mitteilung wollen wir die Ergebnisse unserer Untersuchung des Verwendungsstoffwechsels des Tuberkelbazillus besprechen. Da sich, wie vorweg genommen werden mag, im Verwendungsstoffwechsel der beiden Typen des Tuberkelbazillus, des Typus bovinus und des Typus humanus, keine Unterschiede ergeben haben, wollen wir sie gemeinsam behandeln.

Eingehend soll der Kohlenstoff- und der Stickstoffstoffwechsel der Tuberkelbazillen beschrieben werden. Was den Mineralstoffwechsel betrifft, so werden wir ihn in einer späteren Mitteilung im Zusammenhang mit dem Mineralstoffwechsel anderer säurefester Bakterien behandeln. Die wesentlichsten Ergebnisse dieser Arbeit sind vor längerer Zeit von *H. Braun* und *S. Kondo*[1]) mitgeteilt worden.

Die verwendete Methodik ist in früheren Mitteilungen besprochen worden, und wir dürfen deshalb auf die Veröffentlichungen in dieser Zeitschrift, Bd. 131, 145 und 146, verweisen. Zunächst wollen wir die Eigenschaften der untersuchten Stämme beschreiben.

Stamm 1, Tuberkelbazillus des Typus humanus. Diesen erhielten wir von Herrn Prof. *Bruno Heymann*, dem wir auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank sagen möchten. Er wächst auf Glycerinbouillon und auf Lubenaunährboden ziemlich üppig, bildet krümelige Häutchen, bestehend aus schlanken grampositiven und säurefesten Stäbchen. Auch in der gewöhnlichen Nährbouillon läßt er sich züchten. Er wächst auch darin ziemlich üppig. Was die Virulenz für Meerschweinchen und Kaninchen betrifft, so ist sein Verhalten folgendes: Subkutan infizierte Meerschweinchen sterben nach mehreren Monaten an allgemeiner Tuberkulose. Subkutan infizierte Kaninchen leben monatelang. Nach 6 Monaten getötet, zeigen sie eine starke Schwellung und Verkäsung der der Infektionsstelle zugehörigen Lymphdrüsen. An den inneren Organen sind keinerlei tuberkulöse Veränderungen festzustellen. In den verkästen Lymphdrüsen sind mikroskopisch reichlich Tuberkelbazillen nachweisbar.

Stamm 2, Typus humanus. Diesen verdanken wir Herrn Geheimrat *Kolle* und Herrn Prof. *Schlossberger*. Er zeigt ein gutes und charakteristisches Wachstum auf Glycerinbouillon und Lubenaunährboden. Auf gewöhnlicher Bouillon wächst er sehr kümmerlich und die Passagen reißen bald ab. Mikroskopisch bestehen die Kulturen aus schlanken, grampositiven und säurefesten Stäbchen. Subkutan infizierte Meerschweinchen sterben nach 4 Monaten an allgemeiner Tuberkulose. In den Lungenausstrichen sind reichlich Tuberkelbazillen nachweisbar. Infizierte Kaninchen leben monatelang. Nach 5 Monaten getötet, zeigen sie an der Infektionsstelle Drüsenschwellung. An den inneren Organen sind keinerlei tuberkulöse Veränderungen feststellbar.

Stamm 3, Typus humanus, den wir uns aus tuberkulösem Sputum reingezüchtet haben. Er zeigt auf Lubenaunährboden und in Glycerinbouillon gutes und charakteristisches Wachstum. In der gewöhnlichen Bouillon wächst er kümmerlich. Passagen lassen sich in diesem Nährboden

[1]) Der Verwendungsstoffwechsel des Tuberkelbazillus. Klin. Wochenschrift 1924, 3. Jahrg., Nr. 1.

nicht durchführen. Mikroskopisch verhält sich dieser Stamm typisch. Subkutan infizierte Meerschweinchen sterben in den ersten 2 Monaten an allgemeiner Tuberkulose. Subkutan infizierte Kaninchen leben monatelang. Nach 5 Monaten getötet, zeigen sie außer Schwellung an den der Infektionsstelle zugehörigen Lymphdrüsen keinerlei tuberkulöse Prozesse an den inneren Organen.

Stamm 4, Typus humanus, wurde von uns aus tuberkulösem Sputum reingezüchtet. Morphologisch und kulturell auf Lubenau und in Glycerinbouillon typisch. Subkutan infizierte Meerschweinchen sterben nach 2 Monaten an allgemeiner Tuberkulose. Subkutan infizierte Kaninchen zeigen an der Injektionsstelle Abszesse oder verkäste Lymphdrüsenpakete, die inneren Organe sind aber frei von Tuberkulose.

Stamm 5, Typus bovinus. Diesen Stamm verdanken wir Herrn Prof. *Heymann* in Berlin. Derselbe wächst auf Lubenaunährboden und in Glycerinbouillon gut und typisch. In gewöhnlicher Bouillon kommt er nur mühsam fort und die Passagen reißen ab. Subkutan infizierte Meerschweinchen bleiben mehrere Monate am Leben. Nach durchschnittlich 5 Monaten sterben sie. Bei der Sektion waren die Lymphdrüsen in der Nähe der Injektionsstelle stark geschwollen und verkäst. Die Lumbaldrüsen waren vergrößert, die Milz dagegen häufig ohne makroskopische Veränderungen. Dagegen waren an der Lunge reichlich Tuberkeln vorhanden. Subkutan infizierte Kaninchen lebten einige Monate; nach einem halben Jahre getötet, zeigten sie außer Schwellung der Lymphdrüsen an der Injektionsstelle an den inneren Organen makroskopisch keine Veränderungen, mit Ausnahme der Lungen, in denen sich zahlreiche große Knoten befanden, in denen reichlich Tuberkelbazillen feststellbar waren.

Stamm 6, Typus bovinus. Die Kultur verdanken wir Herrn Geheimrat *Kolle* und Herrn Prof. *Schlossberger*. Wachstum in Glycerinbouillon und Lubenaunährboden gut und typisch; auf gewöhnlicher Bouillon nur kümmerliches Wachstum, Virulenz bei subkutaner Injektion sowohl für Meerschweinchen wie auch für Kaninchen vorhanden. Die Meerschweinchen starben nach etwa 4 Monaten an allgemeiner Tuberkulose. Die subkutan infizierten Kaninchen starben gleichfalls nach etwa 4 Monaten. Sie zeigen an der Infektionsstelle in der Inguinalgegend große verkäste Lymphdrüsenpakete. An den inneren Organen sind makroskopisch tuberkulöse Prozesse nicht mit Sicherheit festzustellen, nur in der Lunge zahlreiche große, gelblichgraue Knoten mit massenhaft Tuberkelbazillen.

Der Verwendungsstoffwechsel der Tuberkelbazillen.

Bevor wir auf die Beschreibung des Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsels eingehen, müssen wir zunächst darüber berichten, ob der Typus humanus und Typus bovinus des Tuberkelbazillus die Verunreinigungen der Brutschrankluft verwerten kann. Wir haben in den vorhergehenden Mitteilungen darauf aufmerksam gemacht, daß die säurefesten Saprophyten die stickstoff- und kohlenstoffhaltigen Verunreinigungen der Brutschrankluft assimilieren und daß die Kaltblütertuberkelbazillen und die Hühnertuberkelbazillen die stickstoffhaltigen Substanzen der Brutschrankluft verwerten. Wie verhalten sich nun die Tuberkelbazillen? Wir haben alle Stämme daraufhin

untersucht, ob sie in einer Nährlösung, der wir keinerlei Stickstoffquelle zusetzten, bei Zutritt der Brutschrankluft zu gedeihen vermögen, und konnten uns davon überzeugen, daß es in der Tat der Fall ist[1]). In einer Nährflüssigkeit, die in 100 ccm Wasser 0,5 g NaCl, 0,2 g Phosphatgemisch, 0,005 g Magnesiumsulfat und 0,5 g Natriumacetat enthielt, gediehen die Tuberkelbazillen in Passagen. Besonders gutes und üppiges Wachstum war dann feststellbar, wenn wir der Nährflüssigkeit als Kohlenstoffquelle statt Essigsäure ½ Proz. Glycerin zusetzten. Alle Stämme ließen sich ohne Schwierigkeit in Passagen züchten. Diese Tatsache ist von besonderem Interesse: Alle ernährungsphysiologischen Untersuchungen über die Verwertung stickstoffhaltiger Stoffe sind nur dann einwandfrei, wenn den Mikroorganismen *reine* Luft dargeboten wird. Die gewöhnliche Brutschrankluft stellt eine wichtige Fehlerquelle für derartige Untersuchungen dar. Andererseits ist diese Feststellung deshalb bemerkenswert, weil sie uns zeigt, wie genügsam der *pathogene Tuberkelbazillus* ist. Die geringen Mengen stickstoffhaltiger Verunreinigungen der Brutschrankluft vermag er auszunutzen, um daraus seinen Körper aufzubauen! Um was für stickstoffhaltige Stoffe es sich dabei handelt, vermögen wir nicht zu sagen. Besonders darauf gerichtete Untersuchungen sind im Gange. Am wahrscheinlichsten ist es, daß es der Ammoniak ist.

Die kohlenstoffhaltigen Verunreinigungen der Brutschrankluft vermögen die Tuberkelbazillen *nicht* zu verwerten. In einer Nährlösung, die in 100 ccm Wasser 0,5 g NaCl, 0,5 g Ammoniumsulfat, 0,005 g Magnesiumsulfat und 0,2 g Phosphatgemisch enthält, können sie sich auch nach wochenlanger Bebrütung nicht vermehren. Die Untersuchung des Kohlenstoffverwendungsstoffwechsels ist also auch bei Verwendung der gewöhnlichen ungereinigten Brutschrankluft möglich, und wir wollen jetzt an die Besprechung desselben gehen.

A. Der Kohlenstoffverwendungsstoffwechsel der Tuberkelbazillen.

Bei der Untersuchung der Kohlenstoffquellen gingen wir von einer Stammlösung aus, die in 100 ccm doppelt destillierten Wassers 1 g NaCl, 1 g Ammoniumsulfat, 0,01 g Magnesiumsulfat, 0,4 g Phosphatgemisch enthielt. p_H, nach *Michaelis* bestimmt, betrug meistens 7,1. 1 proz. Lösungen der verschiedenen Kohlenstoffquellen wurden zu gleichen Teilen mit der Stammlösung zusammengemischt, so daß der Prozentgehalt an den verschiedenen Substanzen auf die Hälfte der Stammlösung gesunken ist. Jede Nährlösung wurde vor der Benutzung auf Reaktion geprüft und, wenn nötig, mit n-Sodalösung neutralisiert.

[1]) Viele von diesen Versuchen hat Fräulein Dr. *R. Goldschmidt* ausgeführt.

Die dargebotene kohlenstoffhaltige Substanz war stets die *einzige* Kohlenstoffquelle. Die Züchtungen wurden alle bei 37^0 vorgenommen und die Kulturen bis zu 2 Monaten bebrütet.

a) Verwertung der organischen Säuren.

Als einfachste Kohlenstoffquelle wurde die *Ameisensäure* geprüft. Als ameisensaures Natrium in ½proz. Konzentration wurde sie weder von den Tuberkelbazillen des Typus humanus, noch von den des Typus bovinus verwertet. Keiner von den sechs Stämmen ließ sich züchten.

Die in den vorhergehenden Mitteilungen behandelten säurefesten Bakterien verwerteten die *Essigsäure* als Kohlenstoffquelle. Auch die Tuberkelbazillen vermögen die Essigsäure gut auszunutzen. Alle sechs untersuchten Tuberkelbazillenstämme ließen sich in Passagen in einem Nährboden züchten, der außer den notwendigen Mineralien Ammoniak als Stickstoffquelle und Natriumacetat als einzige Kohlenstoffquelle enthielt. Setzte man den Nährböden 1 Proz. von Natriumacetat hinzu, so war das Wachstum ein schwächeres. Bei 2 Proz. Natriumacetat wuchsen die Tuberkelbazillen entweder nur sehr kümmerlich oder gar nicht. Den Stamm 1 konnten wir innerhalb von 4 Monaten im Acetatnährboden in fünf Passagen züchten, die Stämme 2, 3 und 5 innerhalb von 5 Monaten und Stamm 6 innerhalb von 6 Monaten. Zu bemerken wäre, daß die Üppigkeit des Wachstums bei den verschiedenen Stämmen im Acetatnährboden eine ungleiche war, manche wuchsen sehr gut und schnell, wie z. B. die Stämme 1 und 6, in Form eines weißlichen Häutchens, andere dagegen langsam und in Form eines zarten Häutchens, wie die Stämme 2 bis 5. Die Stäbchen waren morphologisch ohne Besonderheiten, waren gram- und ziehlpositiv.

Propionsäure und *Buttersäure,* in ½proz. Konzentration als Natriumsalze, wurden von den Tuberkelbazillen (Stämme 1, 2, 4 und 6) nicht verwertet.

Was nun die *Milchsäure* betrifft, die wir als milchsaures Natrium den Tuberkelbazillen dargeboten haben, so wurde diese von keinem der sechs untersuchten Stämme verwertet. Es ließ sich zwar in den ersten Passagen manchmal ein sehr geringes Anwachsen der Bakterien feststellen. Es war aber immer so gering, daß Passagen nicht angelegt werden konnten.

Die *Bernsteinsäure,* die *Äpfelsäure,* die *Weinsäure* und die *Citronensäure* als Natriumsalze in ½proz. Konzentration wurden von keinem der sechs untersuchten Tuberkelbazillenstämme verwendet. Zwar war auch hier öfters ein geringes Anwachsen bei der erstmaligen Beimpfung in einem solchen künstlichen Nährboden wahrzunehmen, es war aber nicht möglich, Passagen zu gewinnen.

Von den untersuchten *organischen Säuren* der Fettreihe wurde demnach von den Tuberkelbazillen nur die Essigsäure als *einzige* Kohlenstoffquelle *regelmäßig* verwertet. Die höheren kohlenstoffreicheren Säuren wurden dagegen nicht unmittelbar angegriffen. Damit soll selbstverständlich nicht gesagt sein, daß diese Säuren vom Tuberkelbazillus überhaupt nicht verwertet werden. Sie können aber nicht unmittelbar angegriffen werden. Es müssen zu ihrer Spaltung andere Energiequellen zur Verfügung stehen.

b) Verwertung von Alkoholen.

Methylalkohol, *Äthylalkohol* und *Amylalkohol* wurden von den sechs untersuchten Tuberkelbazillenstämmen in ½proz. Konzentration nicht verwertet.

Was das *Glycerin* betrifft, so ist es seit den Untersuchungen von *Nocard* und *Roux* bekannt, daß es eine für Tuberkelbazillen besonders gut verwertbare Kohlenstoffquelle ist. Alle sechs Stämme ließen sich auf einem Nährboden, der die notwendigen Mineralien und Ammoniak als einzige Stickstoff- und Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, gut züchten. Wie bei der Essigsäure, konnten wir auch beim Glycerin feststellen, daß in der Verwertbarkeit individuelle Differenzen vorhanden sind. Die Stämme 1, 3, 5 und 6 wuchsen in diesem Nährboden sehr gut und bildeten kräftige weißliche Häutchen. Die Stämme 2 und 4 wuchsen dagegen sehr viel zögernder und zarter. Verglich man das Wachstum der einzelnen Stämme im Glycerinnährboden mit dem im Acetatnährboden, so ergab sich folgendes: Der Stamm 1 wuchs sowohl mit Acetat wie mit Glycerin gut. Die Stämme 2 und 3 wuchsen sowohl im Acetat- wie im Glycerinnährboden nicht sehr üppig. Der Stamm 5 wuchs besser mit Glycerin wie mit Acetat.

Mannit wurde von keinem der sechs untersuchten Tuberkelbazillenstämme als einzige Kohlenstoffquelle angegriffen.

c) Kohlehydrate.

Von diesen haben wir zunächst *Traubenzucker* untersucht, und zwar haben wir alle sechs Tuberkelbazillenstämme auf die Assimilierbarkeit des Traubenzuckers geprüft. Sie verhielten sich nicht gleich. Deshalb wollen wir die Verwertbarkeit des Traubenzuckers durch die verschiedenen Stämme einzeln besprechen.

Der Stamm 1 wuchs in einem Nährboden, der ½ Proz. Traubenzucker als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, nicht sehr üppig, und es dauerte meist längere Zeit, bevor ein deutliches Anwachsen feststellbar war. Die Ausdehnung des Häutchens blieb immer eine geringe und die Passagen rissen manchmal ab.

Der Stamm 2 ließ sich ohne Schwierigkeiten in Passagen züchten. Das Anwachsen geschah in relativ kurzer Zeit, und das gebildete Häutchen breitete sich über die ganze Flüssigkeitsoberfläche aus.

Der Stamm 3 wuchs im Traubenzuckernährboden nicht. Bei der erstmaligen Beimpfung des Nährbodens hatte man gelegentlich den Eindruck gehabt, als ob sich die Bakterien vermehrt hätten, Passagen sind aber nicht gelungen.

Der Tuberkelbazillenstamm 4 ließ sich im Traubenzuckernährboden züchten. Das Anwachsen der Kultur ließ sehr lange Zeit auf sich warten und die Ausbreitung des Häutchens war eine geringe.

Der Stamm 5 wuchs mit Traubenzucker als einziger Kohlenstoffquelle sehr kümmerlich und es ließen sich nur einige Passagen durchführen.

Stamm 6 wurde im Laufe von 5 Monaten in fünf Passagen gezüchtet. Er wuchs öfters sehr langsam an, aber bei längerer Bebrütung entwickelte sich ein kräftiges, die ganze Oberfläche der Flüssigkeit bedeckendes Häutchen.

Wie beim Glycerin sehen wir auch beim Traubenzucker eine individuell verschiedene Befähigung zur Assimilation. Einzelne Stämme verwenden den Traubenzucker als einzige Kohlenstoffquelle gut, andere dagegen assimilieren ihn entweder schlecht oder gar nicht.

Was *Lävulose* und *Arabinose* betrifft, die wir in $\frac{1}{2}$proz. Konzentration den Nährböden als einzige Kohlenstoffquelle zufügten, so vermochte keiner der sechs untersuchten Tuberkelbazillenstämme diese Kohlenhydrate anzugreifen. Zwar hatte man öfters den Eindruck, als ob in der ersten Passage ein geringes Anwachsen stattgefunden hätte, doch waren Passagen nicht durchführbar.

B. Verwertung der Stickstoffquellen.

1. Ammoniak.

Wie bereits in der grundlegenden Arbeit von *Proskauer* und *Beck* angegeben worden ist, vermögen die Tuberkelbazillen Ammoniak als Stickstoffquelle zu verwenden. Das haben die Untersuchungen von *Lockemann, Long* und unsere eigenen Erfahrungen bestätigt. Allerdings ist in den früheren Untersuchungen die Fehlerquelle unberücksichtigt geblieben, welche die Brutschrankluft darstellt. Wie in den vorhergehenden Mitteilungen über den Verwendungsstoffwechsel der säurefesten Saprophyten, der Kaltblütertuberkelbazillen, der Hühnertuberkelbazillen und auch in dieser Mitteilung über menschliche und Rindertuberkelbazillen gezeigt worden ist, vermögen diese Mikroorganismen, wenn im Nährboden ausreichende Kohlenstoffquellen bei

Fehlen einer Stickstoffquelle dargeboten werden, mit Erfolg die stickstoffhaltigen Verunreinigungen der Brutschrankluft auszunutzen. Ist z. B. Glycerin als Kohlenstoffquelle im Nährboden anwesend, dann wachsen die Tuberkelbazillen beim reichlichen Zutritt der Brutschrankluft ohne Zusatz einer Stickstoffquelle gut. Es bilden sich ausgedehnte weißliche Häutchen. Arbeitet man also nicht mit reiner Luft, so muß berücksichtigt werden, daß nicht nur die im Nährboden gelieferte Stickstoffquelle, sondern auch die Luftverunreinigungen oder sogar diese allein die Stickstoffquellen darstellen. Wir möchten aus diesem Grunde unsere frühere Angabe, daß die Tuberkelbazillen auch Nitrat zu verwerten imstande sind, so lange als nicht sichergestellt betrachten, bis die Versuche mit reiner Luft wiederholt sind.

2. Aminosäuren.

Wie bei der Prüfung der anderen säurefesten Bakterien, gingen wir auch bei der Untersuchung der Tuberkelbazillen so vor, daß wir die Aminosäuren in einer Versuchsreihe als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle, in einer zweiten Versuchsreihe nur als Stickstoffquelle den Bakterien dargeboten haben. In den zuletzt erwähnten Versuchen fügten wir Natriumacetat oder Glycerin in ½proz. Konzentration als zweite Kohlenstoffquelle hinzu. Es wurden von uns folgende Aminosäuren geprüft: Glykokoll, d-Alanin, asparaginsaures Natrium, l-Leucin, l-Tyrosin. Der Nährboden enthielt in 100 ccm doppelt destillierten Wassers folgende Stoffe: 0,5 g NaCl, 0,2 g Phosphatgemisch, 0,005 g Magnesiumsulfat und 0,5 g Aminosäure (bei l-Tyrosin 0,05 g). In der zweiten Versuchsreihe wurden noch 0,5 g Natriumacetat oder 0,5 g Glycerin hinzugefügt.

In einem Nährboden, der Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure, Leucin und Tyrosin als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle enthielt, ließen sich die sechs untersuchten Tuberkelbazillenstämme nicht in Passagen züchten. Bei der ersten Beimpfung in einen solchen Nährboden trat gelegentlich eine geringe Vermehrung ein, sie reichte aber nicht dazu aus, Passagen anzulegen. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit einigen Erfahrungen, über die *Long* berichtet.

Enthielt der Nährboden außer der Aminosäure als zweite Kohlenstoffquelle Acetat, so verhielten sich die Stämme folgendermaßen:

Der Stamm 1 wuchs mit Glykokoll oder Tyrosin als einziger Stickstoffquelle und Acetat als zweiter Kohlenstoffquelle bei der ersten Verimpfung an, ließ sich aber nicht in Passagen züchten. Mit Alanin, Leucin oder Asparaginsäure und Acetat ließ sich der Stamm 1 ohne Schwierigkeit in Passagen züchten. Das Wachstum war ein recht gutes.

Stamm 2 gedieh mit Tyrosin und Acetat als zweiter Kohlenstoffquelle nicht in Passagen. Er wuchs zwar gelegentlich in der ersten Passage an, aber so kümmerlich, daß Abimpfungen nicht möglich waren. Mit Glykokoll und Acetat ließ er sich in Passagen züchten, aber die Kulturen waren nicht sehr üppig, und es bedurfte einer Zeit von einem halben Jahre, um ihn in fünf Passagen fortzuführen. Auch mit Alanin, Asparaginsäure oder Leucin ließen sich bei Anwesenheit des Acetats Kulturen gewinnen. Bei Alanin und Asparaginsäure war die Kulturausbeute meist keine sehr gute, dagegen bei Leucin war das Häutchen kräftig und die Gewinnung von Passagen machte keine Schwierigkeiten. Bei Glycerinanwesenheit wuchs er mit Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure gut in Passagen.

Der Stamm 3 vermehrte sich mit Glykokoll oder Tyrosin und Acetat als zweiter Kohlenstoffquelle nicht. Mit Alanin oder Asparaginsäure als Stickstoff- und Acetat als Kohlenstoffquelle ließ er sich zwar züchten, doch war das Wachstum nur ein geringes. Mit Leucin und Essigsäure wuchs er gut und ohne Schwierigkeiten in Passagen. Wählte man Glycerin als zweite Kohlenstoffquelle, so ließen sich sowohl mit Glykokoll, wie mit Alanin, Asparaginsäure, Leucin, Passagen ohne Schwierigkeiten gewinnen. Nur mit Tyrosin wuchs der Stamm auch bei Glycerinanwesenheit nicht.

Stamm 4 wuchs mit Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure und Acetat als zweite Kohlenstoffquelle kümmerlich. Besser war das Wachstum mit Leucin und Acetat; kein Wachstum bei Tyrosin und Acetat. Bei Glycerinanwesenheit ließ er sich mit den oben genannten Aminosäuren mit Ausnahme des Tyrosins ohne Schwierigkeit in Passagen züchten.

Stamm 5 gedieh mit den Aminosäuren bei Acetatanwesenheit außerordentlich kümmerlich und ließ sich nicht in mehreren Passagen züchten. Bei Glycerinanwesenheit ließ er sich mit Alanin, Asparaginsäure oder Leucin in Passagen züchten, wuchs dagegen mit Tyrosin nicht. Es ist bemerkenswert, daß sich der Stamm mit Ammoniak und Acetat ohne Schwierigkeiten fortzüchten ließ, dagegen mit Aminosäuren als Stickstoffquelle und Acetat als zweiter Kohlenstoffquelle viel schlechter wuchs. Hier war das Glycerin geeigneter. Der Grund für dieses Verhalten ist schwer anzugeben, und diese Tatsache bedarf einer genaueren Untersuchung.

Stamm 6 war nicht so anspruchsvoll wie der vorher besprochene Tuberkelbazillenstamm des Typus bovinus. Er ließ sich bei Acetatanwesenheit mit Glykokoll, Alanin, Leucin in Passagen züchten; dagegen gelang eine Züchtung mit Acetat und Tyrosin nicht in Passagen. Mit Asparaginsäure und Acetat ließ er sich kultivieren, doch war das Wachstum kein üppiges.

Tabelle I.

Die Assimilierbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen durch den Tuberkelbazillus Typus humanus und bovinus. Zum Vergleich ist der Kohlenstoffverwendungsstoffwechsel des Hühnertuberkelbazillus beigefügt.

Zeichenerklärung: + bedeutet Wachstum in Passagen, 0 bedeutet kein Wachstum; +? bedeutet kümmerliches Wachstum in den ersten Passagen, aber nicht dauernd fortzüchtbar; 0? meist nicht gewachsen, nur gelegentlich in der ersten Passage sehr kümmerlich; — bedeutet nicht untersucht.

Kohlenstoffquelle	Ameisensäure	Essigsäure	Propionsäure	Buttersäure	Milchsäure	Bernsteinsäure	Äpfelsäure	Weinsäure	Citronensäure
Stickstoffquelle	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3
Tuberkelbazillus Typ. hum. Stamm 1	0	+	0	0	0	0	0	0	0
Tuberkelbazillus Typ. bov. Stamm 6	0	+	0	0	0	0	0	0	0
Hühnertuberkelbazillus	0	+	0	0	0	0	0	0	0

Kohlenstoffquelle	Methylalkohol	Äthylalkohol	Amylalkohol	Glycerin	Mannit	Traubenzucker	Lävulose	Arabinose
Stickstoffquelle	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3
Tuberkelbazillus Typ. hum. Stamm 1	0	0	0	+	0	+ schwach	0	0
Tuberkelbazillus Typ. bov. Stamm 6	0	0	0	+	0	+	0	0
Hühnertuberkelbazillus	0	0	0	+ öft. zögernd	0	0?	0	0

Tabelle II. Assimilierbarkeit verschiedener Stickstoffquellen durch den Tuberkelbazillus Typus humanus und bovinus. Zum Vergleich ist der Stickstoffverwendungsstoffwechsel des Hühnertuberkelbazillus beigefügt. Zeichenerklärung wie Tabelle I.

Kohlenstoffquelle	Acetat	Glykokoll	d-Alanin	Asparaginsäure	l-Leucin	l-Tyrosin	Harnstoff	Harnsäure
Stickstoffquelle	NH_3	Glykokoll	d-Alanin	Asparaginsäure	l-Leucin	l-Tyrosin	Harnstoff	Harnsäure
Tuberkelbazillus Typ. hum. Stamm 1	+	0	0	0	0	0	0	0
Tuberkelbazillus Typ. bov. Stamm 6	+	0	0	0	0	0	0	0
Hühnertuberkelbazillus	+	0	0	0	0	0	0	0

Kohlenstoffquelle	Acetat	Acetat	Acetat	Acetat	Acetat	Acetat	Acetat
Stickstoffquelle	Glykokoll	d-Alanin	Asparaginsäure	l-Leucin	l-Tyrosin	Harnstoff	Harnsäure
Tuberkelbazillus Typ. hum. Stamm 1	0?	+	+	+	0	0	+
Tuberkelbazillus Typ. bov. Stamm 6	+	+	+ schwach	+	0	0	+
Hühnertuberkelbazillus	+	+	+	+	+ langsam	0	+

3. Andere organische Stickstoffverbindungen.

Von anderen stickstoffhaltigen organischen Verbindungen haben wir auf ihre Eignung als Stickstoffquelle Harnstoff und Harnsäure geprüft.

Wurde *Harnstoff* und *Harnsäure* als einzige Stickstoff- *und* Kohlenstoffquelle den Tuberkelbazillen dargeboten, so konnte sich keiner der untersuchten sechs Tuberkelbazillenstämme vermehren. Den Harnstoff setzten wir der Lösung in ½proz. Konzentration hinzu. Mit Harnsäure, die schwer löslich ist, sättigten wir die Nährlösung. Setzten wir als zweite Kohlenstoffquelle Essigsäure hinzu, so konnten sich mit Harnstoff die untersuchten Stämme 1, 5 und 6 nicht vermehren. Die anderen Stämme wurden nicht untersucht. Mit Harnsäure und Acetat wuchsen die Stämme 1, 2, 3, 5 und 6 in Passagen. Allerdings war das Wachstum häufig ein geringes.

Wir möchten hier nochmals auf die Tatsache hinweisen, daß die stickstoffhaltigen Verunreinigungen der Brutschrankluft mit verwertet werden und daß deshalb alle diese Versuche mit stickstoffhaltigen Substanzen mit reiner Luft überprüft werden müssen.

In den Tabellen I und II finden sich die Resultate der Untersuchung des Kohlenstoff- und des Stickstoffstoffwechsels der drei Typen der Tuberkelbazillen, des Typus humanus, des Typus bovinus und des Typus gallinaceus zusammengestellt.

Überblicken wir die Resultate, so ergibt sich folgendes: Zwischen den drei Typen des Tuberkelbazillus lassen sich prinzipielle Unterschiede im Verwendungsstoffwechsel nicht aufdecken. Charakteristisch für sie ist, daß ihr Verwendungsstoffwechsel außerordentlich eng ist. Nur wenige Substanzen sind es, die sie unmittelbar angreifen können. Bemerkenswert ist, daß sie mit sehr einfach gebauten Körpern auskommen.

In der nächsten Veröffentlichung wollen wir die Rolle der Wasserstoffionenkonzentration für das Wachstum der säurefesten Bakterien in künstlichen Nährböden behandeln.

Über Lichtempfindlichkeit des Trypaflavins.

Vorläufige Mitteilung.

Von

Hanns John.

(Aus dem Institut für Hochgebirgsphysiologie und Tuberkuloseforschung in Davos und dem Deutschen hygienischen Institut in Prag.)

(Eingegangen am 18. Dezember 1924.)

Nach *A. Abelmann*[1]) sind namentlich verdünnte Lösungen von Trypaflavin lichtempfindlich. *R. Stephan*[2]) setzte Patienten, welche Trypaflavin intravenös bekommen hatten, im Sommer intensivem Tageslicht aus und konnte an ihnen die Bildung von vereinzelt, aber stark auftretenden Lichterythemen beobachten.

Aus hier noch nicht zu erörternden Gründen erschien es interessant, zunächst die Wirkung dieses Farbstoffes an unbelichteten und belichteten Tieren zu untersuchen.

Das Ergebnis mehrerer diesem gleich verlaufender in Davos angestellter Versuche sei an nachfolgendem Beispiel mitgeteilt:

Eine weiße Maus bekam am 4. März 1924 11 Uhr vormittags 0,5 ccm einer 0,005proz. Trypaflavinlösung (Trypaflavin, L. Casella & Co., „Für intravenöse Injektion") subkutan injiziert. Das Tier wurde in einem weitmaschigen Drahtkäfig im Freien ins Licht gebracht und verblieb dort bis 5 Uhr nachmittags. Die Maus zeigte während dieser Zeit kein von der Kontrolle verschiedenes Verhalten. Am 5. März 1924, ½9 Uhr vormittags, wurde das Tier tot aufgefunden. Sektionsbefund: Gelbfärbung des Magens und Dünndarms, Lunge und Leber undeutlich gelb verfärbt. Stücke dieser beiden Organe wurden mit kaltem 96proz. Alkohol extrahiert. Die filtrierten Lösungen fluoreszierten und waren in der Durchsicht rosa, in der Aufsicht hellgrün gefärbt. Die Kontrollmaus bekam die gleiche Dosis derselben Lösung, wurde sofort ins Dunkle gebracht und blieb am Leben. Der Urin dieses Tieres war gelb gefärbt. Beide Mäuse zeigten Freßlust.

---

[1]) Pharm. Ztg. 1918, Nr. 45.

[2]) Med. Klinik 1921, S. 492.

Es liegt nahe, auszusprechen, daß Trypaflavin, subkutan und sicher auch intravenös appliziert, im Lichte, insbesondere im starken Sonnenlicht, bereits in geringen Dosen eine große Giftigkeit erlangt.

Inwieweit Beziehungen zwischen dem Lichte und der chemischen Beschaffenheit von Verbindungen, die zur inneren Desinfektion bzw. im Sinne von Sensibilisatoren gebraucht werden, bestehen, bildet Gegenstand einer Untersuchung.

Hinzugefügt sei, daß subkutane Injektionen von 0,5 ccm sowohl in Uviolglas als auch in einer Eprouvette durch mehrere Tage belichteten sterilen 0,005 proz. Trypaflavinlösung an Mäusen nicht tödlich wirkte und daß sich Lösungen von Neosalvarsan und Silbersalversan — in dosi tolerata — selbst bei nachfolgender starker Belichtung der Versuchstiere als unschädlich erwiesen.

Verfütterung von Nitroanthrachinon.

Vorläufige Mitteilung.

Von

Hanns John.

(Aus dem Institut für Hochgebirgsphysiologie und Tuberkuloseforschung in Davos und dem Deutschen hygienischen Institut in Prag.)

(Eingegangen am 18. Dezember 1924.)

Wird reines, bei 222° schmelzendes, l-Nitroanthrachinon an Tiere verfüttert, entstehen daraus Amidoanthrachinon und gleichfalls rot gefärbte, aber alkalilösliche Produkte.

Dieses Ergebnis ist insofern bemerkenswert, weil durch einen solchen Versuch auf einfache Weise rasch das Sauerstoffbedürfnis des Organismus demonstriert werden kann.

Gibt man einer Maus, am besten in befeuchtetes Brot eingeknetet, eine geringe Menge des gelben Nitroanthrachinons, so besitzt der nach kurzer Zeit gelassene Harn derselben eine tief bordeauxrote Farbe, deren Auftreten auf die Bildung rotgefärbter Verbindungen aus dem gelben Nitroanthrachinon zurückzuführen ist. Versetzt man den Harn mit verdünnter Salzsäure oder Kalilauge, scheint es, als ob der Farbstoff durch erstere gelöst, durch letztere ausgefällt würde.

Inwieweit Reduktion des Nitroanthrachinons durch den lebenden Organismus bewirkt wird, welche Produkte hierbei gebildet werden und in welcher Weise der Stoffwechsel, insbesondere der Gasstoffwechsel, hierbei bzw. bei Verfütterung oder anderweitiger Gabe genannter Substanz an Tiere beeinflußt wird, soll später mitgeteilt werden.

Hierorts sei einer der Versuche beschrieben, deren Ergebnis — eingangs bereits kurz angeführt — Ursache zur Aufnahme dieses weiter angelegten experimentellen Studiums bildete.

Zwei weiße Mäuse erhielten innerhalb von 6 Tagen in Dosen von 0,1 g in Brot eingeknetet, 2,5 g l-Nitroanthrachinon vom Schmelzpunkt 222°. Der mit Wasser verdünnte Harn wurde mit Äther ausgeschüttelt, dieser nach Trocknen mit Natriumsulfat abdestilliert und der Rückstand mit Salzsäure behandelt, um das Amido-

anthrachinon aufzunehmen, und diese Flüssigkeit filtriert. Das Filtrat ließ nach Einengen auf Zusatz von Kalilauge einen flockigen Niederschlag ausfallen, der auf einem Filter gesammelt, gewaschen, getrocknet und aus Äther umkristallisiert wurde. Die nach Hinzufügen von Salzsäure zum Ätherrückstand verbliebene feste Substanz wurde mit Kalilauge behandelt und hierbei eine rote Lösung erhalten, aus der nach Filtration beim Versetzen mit Essigsäure rotgefärbte Flocken ausfielen, welche gewaschen und getrocknet wurden. Die Menge des in Säure und des in Alkali löslichen Produktes war derart gering, daß eine genauere Untersuchung derselben unterbleiben mußte. Immerhin konnte festgestellt werden, daß die basisch reagierende Substanz ein kristallisiertes Chlorhydrat gab, welches mit aus l-Amidoanthrachinon hergestelltem verglichen, dessen Aussehen zeigte. Auch könnte gesagt werden, daß etwas unverändertes Nitroanthrachinon aufgefunden wurde und daß der alkalilösliche Stoff wohl in der Hauptmenge Oxyanthrachinon gewesen ist.

Nimmt man quantitative Reduktion der 2,5 g Nitroanthrachinon an, wären hierbei 0,32 g oder (gemessen bei 20^0 und 760 mm Druck) 240,4 ccm Sauerstoff frei geworden. Jede Maus würde demnach etwa 120 ccm Sauerstoff verbraucht haben, was pro 20 g lebenden Organismus eine Zufuhr bzw. eine Resorption von 20 ccm innerhalb von 24 Stunden bedeuten würde.

Es besteht mit Rücksicht auf das Ergebnis dieser Experimente und die eben kurz dargetane Überlegung die Absicht, diese Beobachtung weiter zu verfolgen und nicht nur zu versuchen, die einzelnen Reduktionsprodukte zu fassen und den Gasstoffwechsel zu studieren, sondern auch die allenfallsige Wirkung von per os oder anderweitig gegebenen Nitroanthrachinons oder ähnlichen Verbindungen allein, sowie rücksichtlich der Verbrennung von gleichzeitig als einzige Nahrung verabreichten Stoffen und bei Zuständen eines wie immer herbeigeführten Sauerstoffmangels zu konstatieren.

Zur Veröffentlichung vorstehender Versuche gaben äußere Gründe Veranlassung.

Herrn Prof. Dr. *A. Loewy*, Vorstand des Forschungsinstituts in Davos—Platz, sei an dieser Stelle für sein außerordentliches Wohlwollen und die von ihm geübte liebenswürdige Unterstützung dieser Arbeiten in aufrichtiger Ergebenheit nochmals herzlichst gedankt.

Über die Spaltung und die Oxydation von Benzylalkohol und Benzylestern im menschlichen Organismus.

Von

J. Snapper, A. Grünbaum und S. Sturkop.

(Aus dem pathologischen Institut in Amsterdam.)

(Eingegangen am 18. Dezember 1924.)

Pal[1]) und seine Mitarbeiter haben bei ihren Studien über die Eigenschaften des Papaverins nachgewiesen, daß dieses Alkaloid tonuserniedrigende Eigenschaften besitzt: das Papaverin ist imstande, den Tonus der glatten Muskeln zu erniedrigen und Krämpfe der glatten Muskeln zu lösen.

Macht[2]) hat 1917 darauf hingewiesen, daß viele Verbindungen, die eine Benzylgruppe besitzen, derartige spasmolytische Eigenschaften zeigen. Auch das Papaverin besitzt eine substituierte Benzylgruppe. Diese Benzylgruppe ist aber im Papaverin an ein anderes, sehr verwickeltes Molekül gebunden. Daneben besitzen verschiedene einfache Benzylverbindungen, z. B. Benzylalkohol und verschiedene Benzylester, ebenfalls tonuserniedrigende Wirkung: auf die überlebenden Organe üben diese Verbindungen sehr starke spasmolytische Wirkung aus.

Auf Grund dieser Untersuchungen hat man in der Klinik verschiedene Benzylester, besonders das Benzylbenzoat, angewendet bei Patienten, wo Spasmen der glatten Muskeln die Ursache der Krankheit bildeten. Man erwartete von diesen Verbindungen gute Resultate, weil einerseits diese Ester schon in sehr großer Verdünnung starke spasmolytische Wirkung auf die überlebenden Organe ausüben, andererseits diese Ester ungiftig sind und deshalb in großen Mengen den Patienten zugeführt werden können.

---

[1]) *Pal*, Zentralbl. f. Physiol. 1902, Nr. 3; Med. Klinik 1913, S. 1796; Deutsch. med. Wochenschr. 1914, S. 614.

[2]) *Macht*, Journ. of Pharm. and exper. Therap. **9**, 1917; **11**, 1918.

Das Resultat der praktischen Verwendung der spasmolytischen Eigenschaften der Benzylverbindungen in der Klinik hat aber im allgemeinen enttäuscht. In der Klinik hat man von der oralen Zufuhr von Benzylverbindungen bei Krankheitszuständen, die mit Spasmen der glatten Muskeln zusammenhängen (Asthma, Angina pectoris) nur selten günstige Resultate verzeichnen können.

Zweck der vorliegenden Arbeit ist, eine Erklärung zu geben für den Gegensatz, der besteht zwischen der starken spasmolytischen Wirkung der Benzylester auf überlebende Organe und dem Fehlen einer solchen Wirkung in vivo nach oraler Zufuhr. Dazu haben wir den Stoffwechsel der verschiedenen Benzylderivate im Organismus näher untersucht.

Schon vor langer Zeit hat *Schmiedeberg* nachgewiesen, daß Benzylalkohol im Organismus zu Benzoesäure oxydiert und deshalb als Hippursäure ausgeschieden wird[1]). *Macht* hat diese Tatsache in seiner Abhandlung über die Pharmakologie der Benzylester ausdrücklich betont. Er konnte den größten Teil der zugeführten Benzylverbindungen als Hippursäure im Urin zurückfinden. Die Bedeutung dieser Beobachtung ergibt sich aus der Tatsache, daß weder Benzoesäure noch Hippursäure spasmolytische Eigenschaften besitzen.

Der Organismus hat deshalb die Fähigkeit, den spasmolytisch wirkenden Benzylalkohol zu der in dieser Hinsicht unwirksamen Benzoesäure zu oxydieren. Hieraus ergibt sich, daß die Frage, ob und wie der Benzylalkohol im Organismus seine spasmolytische Wirkung ausüben kann, zusammenhängt mit der Frage, *wieviel Prozent* des Benzylalkohols zu Benzoesäure oxydiert werden, während auch die *Schnelligkeit,* womit diese Oxydation des wirksamen Benzylalkohols zu spasmolytisch unwirksamer Benzoesäure zustande kommt, Beachtung verdient.

Das Problem der Schnelligkeit, womit diese Oxydation des Benzylalkohols nach oraler Zufuhr geschieht, haben wir auf folgende Weise untersucht. Es ist bekannt und wir haben neulich diese Tatsache nochmals betont, daß Benzoesäure, die per os dem Menschen und dem Tiere zugeführt wird, jedenfalls innerhalb 12 Stunden annähernd zu 90 Proz. im Harn erscheint, gebunden an Glykokoll, also in der Form von Hippursäure.

Führt man z. B. dem Menschen 5 g Natrium benzoicum per os zu, dann kann man innerhalb 12 Stunden im Urin ungefähr 5 bis 5,5 g Hippursäure, d. h. 80 bis 90 Proz. der theoretisch möglichen Menge, nachweisen. Diese Hippursäureausscheidung ist innerhalb 12 Stunden beendet. Das Maximum der Ausscheidung fällt schon in die ersten 6 Stunden.

[1]) *Schmiedeberg,* Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **14**, 1881.

Wir kennen also die Zeit, welche der Organismus braucht, um die Benzoesäure aus dem Darm zu resorbieren, an Glykokoll zu kuppeln und als Hippursäure im Harn auszuscheiden. Wenn nun auch zugeführter Benzylalkohol innerhalb 12 Stunden oder gar innerhalb 6 Stunden zu 75 bis 90 Proz. als Benzoesäure oder Hippursäure im Harn erscheinen würde, so müßte man hieraus schließen, daß der Benzylalkohol nur während sehr kurzer Zeit im Körper als Benzylalkohol vorhanden war. Daraus würde sich ergeben, daß der Benzylalkohol gleich nach der Resorption aus dem Darm zu einer spasmolytisch unwirksamen Verbindung, d. h. Benzoesäure, oxydiert wird.

Wir haben deshalb die Hippursäureausscheidung, die nach Zufuhr von Benzylalkohol und Benzylestern per os auftritt, sorgfältig bestimmt.

Die Methode der Hippursäurebestimmung muß für diese Versuche hohen Anforderungen entsprechen. In früheren Untersuchungen haben wir eine Methode benutzt, wobei die Hippursäure als in Äthylacetat löslicher Stickstoff bestimmt wird[1]). Dieser Stickstoff wird dann als Hippursäure umgerechnet. Diese Methode geht sehr schnell und gibt in der von uns angegebenen Modifikation ausgezeichnete Resultate, wenn man Natrium benzoicum zuführt bei Menschen, die Milch- und Breidiät haben: die einzige in Äthylacetat lösliche, stickstoffhaltige Verbindung, die nach Zufuhr von Natrium benzoicum im Harn erscheint, ist Hippursäure. Deshalb kann man, wenn man bestimmte Vorsorge trifft, in derartigen Versuchen aus der Menge in Äthylacetat löslichen Stickstoffs die ausgeschiedene Hippursäure berechnen. In den folgenden Versuchen, wo Benzylalkohol und Benzylester zugeführt werden, war es natürlich notwendig, die Hippursäure zu kristallisieren und zu identifizieren, weil aus genanntem Alkohol und Estern auch andere, in Äthylacetat lösliche, stickstoffhaltige Verbindungen entstehen könnten.

Diese Versuche sind alle gemacht bei Menschen mit gesunden Nieren, denen strenge Milch- und Breidiät vorgeschrieben war, die also normalerweise nur sehr wenig Hippursäure im Harn ausschieden.

Die Hippursäure wurde bestimmt durch Extraktion des mit Ammoniumsulfat gesättigten Harns in einem Apparat von *Lind* oder *Zelmanowicz*. Es wurde während 6 bis 8 Stunden extrahiert mit einem Gemisch von Äther mit 20proz. Alkohol. Nach der Extraktion wurde das Alkohol-Äthergemisch teilweise auf dem Wasserbade abdestilliert, die letzten Reste der Flüssigkeit wurden mittels eines elektrischen Ventilators verjagt. Die überbleibende Kristallmasse wurde in destilliertem Wasser unter Erhitzen gelöst und fraktioniert kristallisiert.

[1]) *Snapper* und *Laqueur*, diese Zeitschr. **145**, 32, 1924.

Für die Reinigung der Kristalle aus der *letzten* Portion der Mutterlauge war gewöhnlich Schütteln mit Carbo animalis (*Merck*) und Abpressen auf einer porösen Tonplatte notwendig.

Die erhaltenen Kristalle wurden nach Trocknung gewogen und zur näheren Identifikation der Schmelzpunkt bestimmt. Nach dieser Methode haben wir in blinden Versuchen 97 bis 98 Proz. der dem Harn zugesetzten Menge Hippursäure als richtig schmelzende Substanz zurückgefunden.

Bevor wir die Hippursäureausscheidung nach Zufuhr von Benzylalkohol und Benzylestern untersuchten, bestimmten wir erst nochmals zum Vergleich die Schnelligkeit der Hippursäureausscheidung nach Zufuhr von Natrium benzoicum.

Über diese Frage findet man abweichende Angaben. Während *wir* fanden, daß die Hauptausscheidung der Hippursäure in den ersten 6 Stunden nach der Benzoesäuregabe stattfindet[1]), konnte *Lewis*[2]) nach Zufuhr von 6 g Natrium benzoicum schon innerhalb 3½ Stunden 85 Proz. des zugeführten Salzes als Hippursäure im Harn nachweisen.

Kingsbury[3]) hat dies Resultat in großen Versuchsreihen bestätigt. Nach Zufuhr von 2,4 g Natrium benzoicum fand er beim normalen Menschen nach 2 Stunden im Mittel 82 Proz., nach 3 Stunden im Mittel 98 Proz. der zugeführten Benzoesäure als Hippursäure im Harn.

Diese Zahlen von 82 und 98 Proz. sind jedenfalls zu hoch, weil *Kingsbury* nicht die Hippursäuremenge, doch nur die Menge gebundene Benzoesäure des Harns bestimmt. Bei diesen Bestimmungen wird also die Benzoeglucuronsäure als Hippursäure mitbestimmt[4]).

Weil diese Frage der Schnelligkeit der Hippursäureausscheidung nach Zufuhr von Natrium benzoicum für die Einrichtung unserer folgenden Versuche von großer Wichtigkeit ist, haben wir diese Frage nochmals geprüft.

Hippursäureausscheidung in den 12 Stunden vor dem Versuch.

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 1005 ccm Urin, 0,093 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 188°).

Um 9 Uhr vormittags 5 g Natrium benzoicum.

9 Uhr vormittags bis 12 Uhr: 330 ccm Urin, 4,614 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 187,5°).

12 Uhr bis 3 Uhr nachmittags: 150 ccm Urin, 0,936 g Hippursäure (Schmelzpunkt 187 bis 188°).

3 bis 6 Uhr nachmittags: 130 ccm Urin, 0,123 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 187°).

---

[1]) *Snapper*, Klin. Wochenschr. 1924, S. 56.
[2]) *Lewis*, Journ. of biol. Chem. 8, 225, 1914.
[3]) *Kingsbury*, Arch. of inter. Med. 32, 175, 1923.
[4]) *J. Neuberg*, diese Zeitschr. 145, H. 3/4, 1923.

6 bis 9 Uhr nachmittags: 700 ccm Urin, 0,119 g Hippursäure (Schmelzpunkt 187 bis 188°).

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 870 ccm Urin, 0,080 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 187,5°).

Aus 5 g Natrium benzoicum können maximal 6,25 g Hippursäure gebildet werden.

In den ersten 3 Stunden nach der Benzoesäuregabe werden 73 Proz. als Hippursäure ausgeschieden, in den zweiten 3 Stunden noch 15 Proz. Die Ausscheidung ist also erst in 6 Stunden ungefähr vollständig. Ein zweiter analoger Versuch gab übereinstimmende Resultate.

Hippursäureausscheidung in den 3 Stunden vor dem Versuch.

6 bis 9 Uhr vormittags: 104 ccm Urin, 0,048 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 187°).

Um 9 Uhr vormittags 5 g Natrium benzoicum.

9 bis 12 Uhr vormittags: 130 ccm Urin, 2,063 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186,5 bis 188°).

12 Uhr vormittags bis 3 Uhr nachmittags: 230 ccm Urin, 3,442 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186,5 bis 188°).

3 bis 6 Uhr nachmittags: 150 ccm Urin, 0,142 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186,5 bis 187,5°).

6 bis 9 Uhr nachmittags: 138 ccm Urin, 0,058 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 188°).

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 335 ccm Urin, 0,129 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186,5 bis 188°).

Auch in diesem Versuch werden in den ersten 3 Stunden 33 Proz., in den zweiten 3 Stunden noch 55 Proz. der zugeführten Benzoesäure (zusammen 88 Proz.) als Hippursäure ausgeschieden.

Weil die Ausscheidung also erst in 6 Stunden ungefähr vollständig ist, haben wir uns bei den folgenden Versuchen an die 6-Stundenperiode gehalten.

Um endlich zu erfahren, ob nicht nach kleinen Gaben Benzoas natricus mehr als 88 Proz. der Benzoesäure als Hippursäure ausgeschieden werden, haben wir nochmals die Ausscheidung nach Eingabe von 2 g Natrium benzoicum untersucht.

Hippursäureausscheidung in den 12 Stunden vor dem Versuch.

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 1270 ccm Urin, 0,180 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 188°).

Um 9 Uhr vormittags 2 g Natrium benzoicum.

9 Uhr vormittags bis 3 Uhr nachmittags: 1125 ccm Urin, 2,205 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 188°).

3 bis 9 Uhr nachmittags: 850 ccm Urin, 0,132 g Hippursäure (Schmelzpunkt 187 bis 188°).

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 910 ccm Urin, 0,183 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 187°).

Aus 2 g Natrium benzoicum können theoretisch 2,5 g Hippursäure entstehen. Aus dem oben stehenden Versuch ergibt sich, daß innerhalb

6 Stunden nach Zufuhr des Natrium benzoicum 88 Proz. der zugeführten Benzoesäure als Hippursäure im Harn erscheinen.

Hiernach haben wir dieselben Bestimmungen nach Zufuhr von Benzylalkohol verrichtet. Nachdem wir uns erst in orientierenden Versuchen überzeugt hatten, daß nach Zufuhr von Benzylalkohol innerhalb 6 Stunden eine große Menge Hippursäure (zwischen 80 und 90 Proz. der bei kompletter Oxydation des Benzylalkohols zu erwartenden Menge) ausgeschieden wurde, wiederholten wir diesen Versuch bei sehr sorgfältiger Bestimmung der Hippursäure durch Kristallisation und folgender Identifizierung.

Hippursäureausscheidung in den 12 Stunden vor dem Versuch.

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 475 ccm Urin, 0,125 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 187°).

Um 9 Uhr vormittags 1,5 g Benzylalkohol.

9 Uhr vormittags bis 3 Uhr nachmittags: 1000 ccm Urin, 1,82 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 188°).

3 bis 9 Uhr nachmittags: 740 ccm Urin, 0,135 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 187°).

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 760 ccm Urin, 0,145 g Hippursäure (Schmelzpunkt 185 bis 187°).

Aus 1,5 g Benzylalkohol können bei kompletter Oxydation 2,47 g Hippursäure entstehen. Aus obenstehendem Versuch ergab sich, daß tatsächlich nach Benzylalkoholzufuhr die Hippursäureausscheidung innerhalb 6 Stunden erledigt war. Es wurden hier aber nur 74 Proz. der bei kompletter Oxydation des Benzylalkohols theoretisch zu erwartenden Menge Hippursäure zurückgefunden.

Bei derartigen Versuchen können sehr leicht Versuchsfehler das Resultat entstellen. Ein Tropfen Benzylalkohol kann bei der oralen Zufuhr verloren gehen, eine Portion Urin kann verschwinden usw. Deshalb haben wir diesen Versuch unter besonderen Vorsorgen nochmals wiederholt.

Hippursäureausscheidung in den 12 Stunden vor dem Versuch.

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 1100 ccm Urin, 0,073 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 187°).

Um 9 Uhr vormittags 1,5 g Benzylalkohol.

9 Uhr vormittags bis 3 Uhr nachmittags: 900 ccm Urin, 2,084 g Hippursäure (Schmelzpunkt 185 bis 187,5°).

3 bis 9 Uhr nachmittags: 360 ccm Urin, 0,045 g Hippursäure (Schmelzpunkt 178 bis 188°).

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 630 ccm Urin, 0,047 g Hippursäure (Schmelzpunkt 185 bis 186°).

Aus diesem Versuch ergibt sich, daß nach Zufuhr von 1½ g Benzylalkohol innerhalb 6 Stunden 2,084 g Hippursäure, d. h. 84,4 Proz. der Menge, die erwartet werden kann bei kompletter Oxydation des Benzylalkohols, im Urin zurückgefunden.

Nach Zufuhr einer äquivalenten Menge Natrium benzoicum erscheinen in derselben Zeit 88 Proz. der theoretisch zu erwartenden Menge Benzoesäure als Hippursäure.

Aus der Übereinstimmung dieser beiden Zahlen nach Benzoesäure- bzw. Benzylalkoholzufuhr kann man schließen, daß weder in der Schnelligkeit, noch in der Intensität der Hippursäureausscheidung Unterschiede bestehen, gleichgültig, ob Natrium benzoicum oder Benzylalkohol per os zugeführt werden.

Die Oxydation des spasmolytisch wirksamen Benzylalkohols zu unwirksamer Benzoesäure geht also im menschlichen Organismus so schnell, daß hierfür fast keine Zeit notwendig zu sein scheint. Der Benzylalkohol wird nach Zufuhr per os so schnell oxydiert, daß der spasmolytisch wirksame Benzylalkohol im menschlichen Organismus eigentlich als unbeständig zu betrachten ist: nach Zufuhr per os kann Benzylalkohol also keine spasmolytische Wirkungen ausüben.

In der Behandlung des kranken Menschen wird aber gewöhnlich kein Benzylalkohol, sondern ein Benzylester benutzt. Es ist die Frage, ob die Verhältnisse bei den Benzylestern vielleicht günstiger liegen als beim Benzylalkohol. Zwar wird gewöhnlich die spasmolytische Wirkung der Benzylester erklärt durch die Tatsache. daß im Organismus aus den Estern der Benzylalkohol abgespalten wird. Es ist deutlich, daß, wenn diese Auffassung richtig ist, die perorale Zufuhr von Benzylestern nur wenig Effekt haben kann, weil der abgespaltene Benzylalkohol sogleich zur unwirksamen Benzoesäure oxydiert wird. Wir kennen aber einige Tatsachen, woraus sich ergibt, daß bei Versuchen in vitro die Benzylester nicht durch den abgespaltenen Benzylalkohol, wohl aber durch das ganze Estermolekül spasmolytische Wirkung ausüben.

Kann man sich vorstellen, daß nach oraler Zufuhr Benzylester als Ester resorbiert werden? Dieses scheint unwahrscheinlich, wenn man bedenkt, daß die gebräuchlichen Benzylester total unlöslich sind. Wir wissen doch, daß unlösliche Ester im allgemeinen aus dem Darm nur resorbiert werden nach Spaltung in Alkohol und Säure. Deshalb müssen wir als sehr wahrscheinlich betrachten, daß auch nach Zufuhr der unlöslichen Ester per os aus dem Darm Benzylalkohol resorbiert wird.

Obgleich es also außerordentlich wahrscheinlich war, daß die Spaltung der Benzylester schon im Darm stattfindet und die Zufuhr von Benzylester also pharmakologisch als Zufuhr von Benzylalkohol betrachtet werden muß, haben wir dennoch die Ausscheidung der Hippursäure nach Zufuhr der Benzylester untersucht. Hierdurch konnten wir einen Eindruck über die Schnelligkeit bekommen, mit der die Spaltung und die Oxydation der Benzylester stattfinden.

Wir fingen mit der Zufuhr von 2 g Benzylacetat an.

7 bis 9 Uhr . . .	260 ccm Urin,	0,062 g	Hippursäure.
Um 9 Uhr 2 g Benzylacetat zugeführt.			
9 bis 11 Uhr . .	230 ccm Urin,	0,756 g	Hippursäure.
11 „ 1 „ . .	150 „ „	1,050 g	„
1 „ 3 „ . .	315 „ „	0,174 g	„
3 „ 5 „ . .	320 „ „	0,032 g	„

Aus 2 g Benzylacetat (Molekulargewicht 150) können bei kompletter Oxydation 2,39 g Hippursäure entstehen.

Während der ersten 6 Stunden nach Zufuhr von Benzylacetat werden schon 83 Proz. der zugeführten Menge komplett oxydiert als Hippursäure im Harn zurückgefunden. Hieraus ergibt sich, daß die Spaltung und Oxydation des Benzylacetats im Körper außerordentlich schnell zustande kommt, so schnell, daß die perorale Zufuhr dieses Esters kaum spasmolytischen Einfluß ausüben kann.

Mit besonderem Interesse haben wir die Schnelligkeit der Spaltung und Oxydation des Benzylbenzoats, des Esters, der am meisten in der Klinik als Spasmolytikum gebraucht wird, untersucht. Auch hier hatten orientierende Versuche uns schon gezeigt, daß eine fast komplette Oxydation stattfinden muß. Die Versuche mit genauer Kristallisation der ausgeschiedenen Hippursäure gaben folgende Resultate.

Hippursäureausscheidung in den 12 Stunden vor dem Versuch.

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 1000 ccm Urin, 0,078 g Hippursäure (Schmelzpunkt 187 bis 188°).

Um 9 Uhr vormittags 1 g Benzylbenzoat zugeführt.

9 Uhr vormittags bis 3 Uhr nachmittags: 570 ccm Urin, 1,208 g Hippursäure (Schmelzpunkt 187,5 bis 189°).

3 bis 9 Uhr nachmittags: 380 ccm Urin, 0,230 g Hippursäure (Schmelzpunkt 185,5 bis 187°).

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 960 ccm Urin, 0,123 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 187,5°).

Aus 1 Molekül Benzylbenzoat müssen 2 Moleküle Hippursäure entstehen. Aus 1 g Benzylbenzoat entstehen also bei kompletter Oxydation 1,69 g Hippursäure. In diesem Versuch konnten während der ersten 6 Stunden 71 Proz., während der zweiten 6 Stunden 14 Proz. der theoretisch zu erwartenden Mengen, zusammen 85 Proz., nachgewiesen werden.

Das Benzylbenzoat wird also im Körper komplett gespalten und oxydiert. Die Ausscheidung der Hippursäure ist aber in diesem Versuch etwas langsamer, als wenn Benzylalkohol zugeführt wird. Es ist wahrscheinlich, daß die Spaltung des Esters im Darm einige Zeit erfordert.

Das Resultat der beiden folgenden Versuche mit Benzylbenzoat ist hiermit in Übereinstimmung.

Hippursäureausscheidung in den 12 Stunden vor dem Versuch.

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 450 ccm Urin, 0,078 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 188°).

Um 9 Uhr vormittags 1 g Benzylbenzoat zugeführt.

9 Uhr vormittags bis 3 Uhr nachmittags: 840 ccm Urin, 1,347 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 187,5°).

3 bis 9 Uhr nachmittags: 510 ccm Urin, 0,092 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 187°).

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 475 ccm Urin, 0,076 g Hippursäure (Schmelzpunkt 185 bis 187°).

In diesem Versuch konnten während der ersten 6 Stunden nach Zufuhr von Benzylbenzoat schon 80 Proz. der Menge Hippursäure gefunden werden, die bei kompletter Oxydation und Spaltung des Benzylbenzoats zu erwarten war. Die Spaltung des Benzylbenzoats und die Oxydation des spasmolytisch wirksamen Benzylalkohols zu unwirksamer Benzoesäure geht hier also so schnell, daß kaum verständlich ist, wie diese Verbindung nach Zufuhr per os spasmolytisch wirksam sein könnte.

Endlich noch ein Versuch mit etwas abweichendem Resultat.

Hippursäureausscheidung in den 12 Stunden vor dem Versuch.

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 375 ccm Urin, 0,044 g Hippursäure (Schmelzpunkt 183 bis 184°).

Um 9 Uhr vormittags 1 g Benzylbenzoat.

9 Uhr vormittags bis 3 Uhr nachmittags: 1700 ccm Urin, 0,540 g Hippursäure (Schmelzpunkt 187,5 bis 188°).

3 bis 9 Uhr nachmittags: 520 ccm Urin, 0,935 g Hippursäure (Schmelzpunkt 184 bis 185°).

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 400 ccm Urin, 0,210 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186,5 bis 187,5°).

In diesem Versuch wurden in den ersten 6 Stunden 32 Proz., in den zweiten 6 Stunden 55 Proz. der theoretisch zu erwartenden Menge Hippursäure ausgeschieden.

Auch in diesem Versuch wurde das Benzylbenzoat komplett gespalten und oxydiert. Die Ausscheidung der gebildeten Hippursäure ist aber in diesem letzten Versuch viel langsamer als in den vorigen. Hierbei muß man aber in Betracht ziehen, daß dieser Patient während des Versuchstages krank wurde und sich bei ihm eine Grippe entwickelte.

Analoge Resultate erhält man bei Zufuhr von anderen Benzylestern. Als erstes Beispiel sei das Benzylhydrozinnamoat angeführt.

Hippursäureausscheidung in den 12 Stunden vor dem Versuch.

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 590 ccm Urin, 0,139 g Hippursäure (Schmelzpunkt 185 bis 187°).

Um 9 Uhr vormittags 1 g Benzylhydrozinnamoat per os.

9 Uhr vormittags bis 3 Uhr nachmittags: 885 ccm Urin, 0,916 g Hippursäure (Schmelzpunkt 187 bis 188°).

3 bis 9 Uhr nachmittags: 620 ccm Urin, 0,459 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 188°).

9 Uhr nachmittags bis 9 Uhr vormittags: 680 ccm Urin, 0,117 g Hippursäure (Schmelzpunkt 185 bis 187°).

Aus 1 g Benzylhydrozinnamoat können bei kompletter Spaltung und Oxydation 1,49 g Hippursäure entstehen. In diesem Versuch können während der ersten 6 Stunden 61 Proz., während der zweiten 6 Stunden 31 Proz. der theoretisch möglichen Menge Hippursäure im Harn nachgewiesen werden.

Spaltung und Oxydation des Benzylhydrozinnamoats verlaufen also analog wie beim Benzylbenzoat.

Endlich haben wir noch verschiedene andere Benzylester untersucht, wobei wir aber die Hippursäureausscheidung in 12stündigen Perioden nach Zufuhr des Benzylderivats bestimmt haben.

Erst noch ein Versuch mit Benzylbenzoat, wobei 2,02 g Benzylbenzoat eingenommen werden.

Vortag (24 Stunden): 1660 ccm Urin, 0,210 g Hippursäure (Schmelzpunkt 185°).

Erste 12 Stunden nach Zufuhr: 1400 ccm Urin, 3,03 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 187°),

Zweite 12 Stunden nach Zufuhr: 1300 ccm Urin, 0,260 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186°),

Nachtrag: 2550 ccm Urin, 0,206 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186°).

Theoretisch können bei kompletter Spaltung und Oxydation aus 2,02 g Benzylbenzoat 3,41 g Hippursäure entstehen. Tatsächlich werden hier innerhalb 12 Stunden ± 90 Proz. dieser Menge im Harn nachgewiesen.

Auch beim Benzylzinnamoat werden derartige Resultate erhalten.

Zugeführt wurde 1 g Benzylzinnamoat.

Vortag (24 Stunden): 1380 ccm Urin, 0,397 g Hippursäure.

Erste 12 Stunden nach Zufuhr: 1090 ccm Urin, 1,210 g Hippursäure (Schmelzpunkt 187,5°).

Zweite 12 Stunden nach Zufuhr: 490 ccm Urin, 0,290 g Hippursäure (Schmelzpunkt 186 bis 187°).

Nachtag: 1300 ccm Urin, 0,269 g Hippursäure.

Aus 1 g Benzylzinnamoat können theoretisch 1,5 g Hippursäure gebildet werden. Innerhalb 12 Stunden können tatsächlich ± 80 Proz. dieser Menge im Urin nachgewiesen werden.

Auch diese Patienten hatten alle strenge Milch- und Breidiät.

Zusammenfassung.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß nach peroraler Zufuhr von Benzylalkohol und Benzylestern (Benzylacetat, Benzylzinnamoat, Benzylhydrozinnamoat, Benzylbenzoat) diese Verbindungen außer-

ordentlich schnell zu Benzoesäure oxydiert werden. Diese Oxydation ist komplett, weil nach Zufuhr von Benzylalkohol und Benzylestern 80 bis 90 Proz. der theoretisch zu erwartenden Menge Hippursäure im Harn erscheint, d. h. dieselbe Menge Hippursäure als nach peroraler Zufuhr von äquivalenten Mengen Natrium benzoicum gefunden werden. Aus der Tatsache, daß nach Zufuhr von Benzylalkohol bzw. den genannten Benzylestern die Hippursäureausscheidung fast genau so schnell und in gleich großen Mengen geschieht als nach Zufuhr von äquivalenter Menge Natrium benzoicum, ergibt sich, daß die Oxydation der spasmolytischen Benzylverbindungen zu unwirksamer Benzoesäure nach Zufuhr per os außerordentlich schnell stattfindet. Weil Benzylester nach Zufuhr per os außerordentlich schnell zu unwirksamen Verbindungen gespalten und oxydiert werden, ist es unwahrscheinlich, daß nach Zufuhr per os diese Benzylester bei krankhaften Zuständen, verursacht von spastischen Kontraktionen des glatten Muskelgewebes (Asthma bronchiale, Angina pectoris), wirksam sein können.

Über den physiologischen Bromgehalt des Blutes.

Zugleich ein Beitrag zum Nachweis kleinster Brommengen.

Von

H. Bernhardt und **H. Ucko.**

(Aus der I. medizinischen Universitätsklinik der Charité.)

(Eingegangen am 24. Dezember 1924.)

Es ist bekannt, daß sich in der Natur die Halogene zwar in verschiedenen Mengenverhältnissen, aber kaum jemals vereinzelt finden lassen. Diese Tatsache, die sowohl für Meerwasser wie Mineralwässer, für Algen wie für die meisten pflanzlichen Lebewesen gilt, besteht mit Wahrscheinlichkeit auch für den tierischen Organismus (so fand z. B. *C. Th. Mörner* Dibromtyrosin in Anthozoen (Korallentiere). Daß darüber bisher sichere Ergebnisse nicht vorhanden sind, liegt vor allem an der Schwierigkeit der Methodik. Es finden sich zwar in der Literatur verstreut einige Untersuchungsangaben, die sich aber vielfach widersprechen und mit den verschiedensten Methoden ausgeführt worden sind.

Übersicht über die bisherige Methodik[1]).

Wenn man die Methoden der Bromuntersuchung chronologisch betrachtet, so findet sich zunächst in der älteren physiologisch-medizinischen Literatur der allgemein übliche qualitative Nachweis des Broms durch seine Braunfärbung von Chloroform oder Schwefelkohlenstoff verwendet. Zum Freimachen des Broms aus seinen Verbindungen sind verschiedene Methoden benutzt worden, meist Chlorwasser bei saurer Reaktion. Hierher gehören die Arbeiten von *Rabuteau* (1868), *Pflaumer, Rosenthal, Redlich, Pötzl, Hess* usw., die sich alle mit dem Nachweis des Broms in verschiedenen Körperflüssigkeiten nach Brommedikation befaßten. Den naheliegenden Gedankengang, diesen Nachweis zu einer quantitativen kolorimetrischen Methode auszuarbeiten, versuchte 1907 *Justus* durchzuführen. Zum Freimachen des Broms verwendete er aber Natriumnitrit und große Mengen *konzentrierter* Schwefelsäure. Die hohen physiologischen Bromwerte, die *Justus* in allen Organen und im Blute feststellte, finden ihre Erklärung in dieser fehlerhaften Methode. Bekanntlich wird Natriumnitrit durch konzentrierte Schwefelsäure unter starker Entwicklung von braunen

---

[1]) Von den sehr zahlreichen Arbeiten über Brom werden hierbei infolge unserer Fragestellung natürlich nur diejenigen berücksichtigt, die bezüglich der Methodik *wesentlich* sind oder Beiträge zur Frage des physiologischen Bromgehaltes darstellen. Auch in einigen Arbeiten, die sich in der Hauptsache mit dem Vorkommen des Jods beschäftigen, wie z. B. die sehr ausführliche Arbeit von *v. Fellenberg*, finden sich Angaben über Brom.

Stickoxyden zersetzt, die vom Wasser absorbiert werden und beim Ausschütteln in Chloroform übergehen. Es handelt sich also bei der *Justus*schen Methode um den kolorimetrischen Vergleich zweier durch Stickoxyde gefärbter Chloroformlösungen, was zur Genüge die auffallenden Resultate des Autors erklärt. In neuerer Zeit hat *Autenrieth* unter Benutzung von Kaliumpermanganat und Schwefelsäure zum Freimachen des Broms eine chemisch einwandfreie quantitative Methode daraus entwickelt. Nachuntersucher (*Wünsche*) fanden, daß mit dieser Methode höchstens 3 bis 4 mg nachweisbar sind und sich etwa nur 88 Proz. ermitteln lassen. Auf einem ähnlichen Prinzip beruht auch die von *Gensler* benutzte Methode, nur daß *Gensler* die braune Br-Farbe nicht kolorimetrisch verglich, sondern das freie Brom direkt in der Untersuchungsflüssigkeit titrimetrisch mittels Chlorwassers bis zum Verschwinden der Farbe bestimmte. Selbstverständlich ist auch diese Methode ziemlich grob und nur für größere Brommengen geeignet; unsere Nachprüfung ergab als unteren Grenzwert etwa 1 mg Br.

Der älteste und bekannteste quantitative Br-Nachweis, der von *Fresenius* stammt und besonders von Chemikern angewendet wird, beruht darauf, daß die als Silbersalze gefällten Halogene (AgCl, AgBr) in der Hitze dem Chlorstrom ausgesetzt werden, nachdem Jod und Fluor zuvor entfernt worden sind. Die Menge des durch den Chlorstrom ausgetriebenen Broms ergibt sich aus der Gewichtsdifferenz der vor und nach der Durchströmung gewogenen Silbersalze. Diese Methode gestattet, wie alle gewichtsanalytischen Methoden, den exakten Nachweis etwa bis zu 0,5 mg, ist aber wegen ihrer Genauigkeit als Kontrollmethode auch heute noch üblich. Einige Autoren benutzen sie auch bei ihren biochemischen Fragestellungen ausschließlich (*Büchner*, *Fessel*, *Bogdandy* u. a.).

Im Jahre 1885 gab *Berglund* zur quantitativen Br-Bestimmung eine neue Methode an. Das durch saures Kaliumsulfat ($KHSO_4$) und $KMnO_4$ frei gemachte Br wird durch einen Luftstrom in Kalilauge getrieben und nach Ansäuern mit Silbernitrat gefällt; das gebildete Hypobromid muß vorher durch Ammoniakzusatz zerstört werden. Diese Methode wurde von *Nencki* und *Schoumow-Simanowski* in der Weise modifiziert, daß das Br in Flaschen mit Jodkalilösung eingeleitet wurde. Das durch das Br frei gemachte Jod bestimmten die Autoren durch Titration mittels Natriumthiosulfatlösung. In dieser oder ähnlicher Form fand das Verfahren als zuverlässig weite Verbreitung (bei *Hondo*, *v. Wyss*, *Bönniger*, *Frey*, *Ellinger* und *Kotake*, *Bernoulli*, *Markwalder* u. a.). *Oppenheimer* fand bei der Nachprüfung der modifizierten *Berglund*schen Methode, daß bei Brommengen unter 20 mg die Fehlergrenze immer größer wird.

Auf ganz andere Weise führte *Swarts* 1889 und anscheinend unabhängig davon *Baubigny* 1897 seine Bromuntersuchungen durch. Sie bedienten sich zum Nachweis der Eigenschaft des Br, mit dem Farbstoff Fluorescein das Eosin — Tetrabromfluorescein — zu bilden. Mit dieser Reaktion fand *Dario-Baldi* auch in normalen Schilddrüsen Br. *Labat* verfeinerte das Verfahren, indem er sich nicht nur auf die dabei auftretende rote Eosinfarbe beschränkte, sondern das gebildete Eosin durch sein charakteristisches Spektrum nachwies. Von 24 auf diese Weise untersuchten Schilddrüsen fand er achtmal kein Br, so daß er die anderen positiven Befunde als Folge therapeutisch zugeführten Broms anspricht. In neuerer Zeit hat *Pillat* im Anschluß an diese Untersuchungen mit derselben Methodik den normalen Br-Gehalt verschiedener Organe festzustellen versucht. Er konnte mit dieser Reaktion bis zu $^3/_{100}$ mg Br nachweisen und kam

zu dem Schluß, daß Br anscheinend kein normaler Bestandteil der tierischen Organe sei[1]). Erwähnt sei noch das schon 1868 von *Bill*, in jüngster Zeit von *Walter* wieder neu gefundene Goldchlorid als Br-Indikator. Die Empfindlichkeit desselben scheint nicht sehr erheblich zu sein (*Walter* konnte Br in einer Verdünnung bis 1 : 5000 nachweisen), und es hat außerdem den Nachteil, daß die durch Brom hervorgerufene goldgelbe Farbe ähnlich einer durch Jod gebildeten, mehr rötlichen ist.

1898 benutzte *Jolles* einen anderen Farbstoff, das Paradimethylphenylendiamin, das in essigsaurer Lösung auch bei Gegenwart der anderen Halogene nur mit Br einen roten Farbenton gibt. *v. Wyss* verwendete diese Reaktion zu seinen qualitativen Br-Untersuchungen und stellte ihre große Empfindlichkeit von 1 : 100000 bei Harn und Blut fest. Zu quantitativen Zwecken ist diese Methode nicht verwendet worden. Auch die quantitative Methode von *Weszelszky* (jodometrische Bestimmung des durch Chlorwasser in Bromat übergeführten Broms) fand keine weitere Verwendung.

Mit einem Verfahren von *Specketer*, daß die Trennung der Halogene mittels des elektrischen Stromes bei verschiedenen Spannungen ermöglichte, versuchte *Přibram* 1906 den physiologischen Br-Gehalt von Gehirn, Leber, Milz und Schilddrüse festzustellen. *Přibram* konnte in den genannten Organen kein Br finden (Grenze der Methode bei etwa 2 mg).

Ein neues Stadium des Br-Nachweises begann, als im Jahre 1913 *Guareschi* ein ganz besonders empfindliches Br-Reagens entdeckte, das durch die übrigen Halogene ebenfalls nicht beeinflußt werde. *Guareschi* fand, daß ein mit dem bekannten *Schiff*schen Aldehydreagens (durch schweflige Säure entfärbtes Fuchsin) getränkter Papierstreifen von freiem Br violett gefärbt wird, während Chlor eine gelbbraune bis rötliche, Jod gar keine Verfärbung gibt. Mit dieser Methode untersuchte *Guareschi* eine große Anzahl von unbelebten und belebten Substanzen und konnte in vielen von ihnen Spuren von Br als regelmäßigen Bestandteil nachweisen. Die Reaktion ist etwa viermal so empfindlich wie die von *Baubigny*, zeigt also noch 0,008 mg Br an. Auch Bromate und Hypobromide geben eine ähnliche Färbung. Eine Reihe von Autoren unternahmen es nun, diesen Br-Nachweis zu einer quantitativen Methode auszugestalten. Hier ist zunächst *Wünsche* zu nennen, der dies auf kolorimetrischem Wege versuchte. Das mit $KMnO_4$ und H_2SO_4 frei gemachte Br wurde durch einen Luftstrom mittels besonderer Apparatur in ein Gefäß überführt, das mit einem bestimmten Volumen des *Schiff*schen Reagens beschickt war, und die entstehende Violettfärbung mit vorher geeichten Farblösungen nach ihrer Intensität verglichen. Die Bestimmungsgrenze war 0,2 mg Br. *Alday-Redonnet* erzielte mit dieser Methodik gute Resultate, betont aber die Schwierigkeit der Methode. Auch *Oppenheimer*, der in einer eingehenden Arbeit die meisten Br-Bestimmungsmethoden kritisch bespricht, konnte die *Wünsche*sche Methode wegen ihrer Umständlichkeit und der nicht leichten Herstellung guter und haltbarer Vergleichslösungen nicht durchführen. *Oppenheimer* ging wieder dazu über, die Entwicklung des freien Br und seine Färbung mittels des *Guareschi*-

[1]) Nach Abschluß unserer Arbeit fiel uns noch eine Mitteilung neuesten Datums von *Lorenz*, *Grau* und *Bergheimer* in die Hände, die nach demselben Prinzip mit *Äthyl*fluorescein eine auch quantitativ verwertbare Methode (Farbskala) angeben.

schen Indikators in demselben Gefäß vor sich gehen zu lassen. Zum Freimachen des Broms benutzte er Chlorwasser bzw. eine Lösung von Calciumhypochlorit (als Caporit im Handel), deren Chlorgehalt beständiger als der des Chlorwassers sein soll. *Oppenheimers* Prinzip stellt einen Vergleich seiner Untersuchungsflüssigkeit mit einer bekannten Br-Lösung dar, und zwar nahm er als Vergleichspunkt den graublauen Umschlagston, den eine bestimmte Br-Lösung bei bestimmtem Caporitzusatz gibt. Dieser Farbton tritt auf, wenn zu dem violetten Br-Fuchsin weiterhin Caporit zugesetzt wird. Durch Reihen mit geringen Intervallen, bei denen er zunächst die Analysenmenge, dann die Caporitlösung variierte, bestimmte er als Näherungswert den Br.-Gehalt. Die Methode gibt Farbendifferenzen noch bei 0,025 mg. Ähnlich ging etwa gleichzeitig *Hartwich* vor, der das durch etappenweisen Zusatz von Chlorwasser jeweilig frei gemachte Br in Chloroform aufnahm und die einzelnen Chloroformmengen durch Indikatorzusatz auf ihren Br-Gehalt prüfte. Diese sukzessive Titration läßt allerdings ein Schwanken um 1 bis 2 mg Br nicht vermeiden. In der Herstellung des Indikators weicht *Hartwich* aber eigenartigerweise erheblich von *Guareschi* ab, obgleich er sich auf ihn bezieht.

Auch französische Autoren versuchten, die *Guareschi*sche Methode quantitativ zu verwenden. *Denigès* und *Chelle*, die die Herstellung und Zusammensetzung des Indikators modifizierten, arbeiteten kolorimetrisch im Chloroformauszug. In neuerer Zeit stellte *Damiens* mit etwas abgeänderter Methodik (durch *Lebeau*) Untersuchungen an Hunden an. Das Brom wurde von ihm durch Kaliumchromat mit konzentrierter Salz- und Schwefelsäure frei gemacht. *Damiens* konnte in den normalen Organen, besonders im Blute, geringe Mengen Brom nachweisen [der Vollblutwert betrug 0,4 bis 0,5 mg-Proz., der Serumwert 0,6 mg-Proz. Br[1])].

Bisherige physiologische Ergebnisse.

Es ist auffällig, daß von den hier in aller Kürze zusammengestellten zahlreichen Arbeiten sich nur verhältnismäßig wenige mit dem physiologischen Br-Gehalt von Organen, Blut oder Exkreten beschäftigen. Die meisten von ihnen befassen sich mit dem pharmakologischen Einfluß des Br oder stellen Beiträge zur Ausscheidung und Verteilung von zugeführten Br-Mengen unter den verschiedensten Bedingungen dar.

Betrachtet man die bisherigen Untersuchungen über den Br-Gehalt des normalen Organismus, so stößt man auf erhebliche Widersprüche. Autoren, wie *Přibram*, *Labat* und *Pillat* lehnen einen normalen Br-Gehalt ab; allerdings fand *Pillat* in einem normalen Harn positive Br-Reaktion. Denselben Befund hatte schon 1868 *Rabuteau* und später *Guareschi* in zwei Fällen. Andererseits konnten *Dario-Baldi* in normalen Schilddrüsen, *Paderi* in der Zirbeldrüse (über seine Methode ist leider Näheres anzugeben nicht möglich) und in neuerer Zeit *Damiens* Br in Blut und einigen Organen von Hunden nachweisen. Eine Diskussion der Befunde von *Justus* erübrigt sich.

[1]) Erwähnt sei noch eine neuere photometrische Methode von *Merke*, die auf der geringeren Lichtempfindlichkeit von AgBr beruht. Sie erlaubt nur eine quantitative Schätzung.

Eigene Untersuchungen.

Unter diesen Umständen lag es nahe, besonders in Berücksichtigung der eingangs erwähnten Überlegungen über das Vorkommen der Halogene in der Natur, die Frage des normalen Br-Gehalts des Organismus mittels der nunmehr verfeinerten Methodik nochmals eingehend zu prüfen. Um den möglicherweise vorhandenen Br-Stoffwechsel mit relativ größter Sicherheit zu erfassen, beschäftigten wir uns zunächst mit der Untersuchung des Blutes. Dadurch war gleichzeitig die Möglichkeit gegeben, bei positivem Ergebnis eine klinisch verwendbare Methode zu schaffen.

Wir gingen also zunächst so vor, daß wir 25 ccm Vollblut im Nickeltiegel mit Ätzkalizusatz veraschten, um anorganisches und organisches Br in KBr überzuführen. Dabei war zunächst zu beachten, daß wegen der bekannten langen Br-Retention die betreffenden Personen niemals, wenigstens nicht in den letzten Monaten Br zu sich genommen hatten und daß zur Gerinnungshemmung des Blutes kein Fluorsalz verwendet wurde. Das Blut wurde zunächst auf kleiner Flamme zur Trockne eingedampft, vorsichtig verkohlt, der Kohlenrückstand mittels eines Glasstabes zerkleinert und kurz auf starker Flamme geglüht. Ein längeres Glühen wurde wegen der Gefahr eventuellen Br-Verlustes vermieden[1]). Um eine fast kohlefreie Asche zu erhalten, war es notwendig, den Rückstand nach mehrstündigem Stehen nochmals zu glühen. Erst bei grauweißer Asche (eventuell mehrmaliges Glühen nötig!) wurde mit Wasser von etwa 40 bis 50^0 ausgelaugt und filtriert. Auf diese Weise erhielt man ein völlig wasserklares Filtrat, das mit Schwefelsäure gegen Phenolphtalein oder Lackmus scharf neutralisiert wurde. Nach mehrfachen Überlegungen versuchten wir den Br-Nachweis in dieser Flüssigkeit mittels der Reaktion von *Guareschi* als der empfindlichsten. Nach Ansäuern des Filtrats (zur deutlichen Färbung wurde vorher auf 30 bis 40 ccm eingeengt) und Zusatz von einigen Tropfen *Schiff*schen Reagenzes (1 prom. Fuchsin-Schwefligesäurelösung) wurde das Br mit Chlorwasser frei gemacht. Es zeigte sich eine *deutliche Br-Reaktion*, die aber nur unter ganz bestimmten Bedingungen auftrat.

1. Zum Neutralisieren und Ansäuern durfte keine *konzentrierte Säure* verwendet werden, die jedenfalls das Br schon aus seinen Verbindungen austreibt. Ebenso verhindert zu starkes Ansäuern die Reaktion. Reihenversuche mit sehr kleinen, gleichen Br-Mengen unter steigendem Säurezusatz überzeugten uns, daß die Br-Fuchsinfarbe

[1]) Glüht man im Nickeltiegel über dem Bunsenbrenner KBr längere Zeit, so tritt merklicher Verlust ein. Wie uns Herr Hofrat *Schlenk* liebenswürdigerweise auf unsere Frage mitteilte, tritt ein solcher Verlust bei Veraschung organischer Substanzen über dem Bunsenbrenner infolge Gegenwart anderer Salze nicht ein. Auch unsere mit Zusatz von KBr zum Blute durchgeführten Veraschungen ergaben keine Abnahme an KBr.

immer schwächer auftrat. (Betont sei noch, daß die *Guareschi*sche Reaktion nur in saurem Milieu möglich ist, da der Farbstoff in alkalischer und neutraler Lösung spontan rot wird.)

2. Die vorhandenen Carbonate, von denen bei dem Neutralisationsvorgang nicht alle unter CO_2-Entwicklung zersetzt werden, gehen durch Chlorwasserzusatz in Chloride über. Diesem Umstand ist es wenigstens zum Teil zuzuschreiben, daß die Br-Reaktion erst nach ziemlich langem Chlorwasserzusatz auftritt. Wir säuerten deshalb das Filtrat zuerst so lange an, bis auch bei starkem Schütteln keine Kohlensäure mehr entwich, und neutralisierten dann mit Natronlauge. Allerdings verbraucht das sich dabei vermehrt bildende $NaHSO_4$ ebenfalls Cl, was wir später durch geringeren Ätznatronzusatz zur Schmelze auf ein Minimum reduzieren konnten. Immerhin tritt die Reaktion niemals wie in einer Bromkalilösung bei den ersten Tropfen Chlorwasser auf.

3. Setzt man zu einer sehr verdünnten Bromsalzlösung Chlorwasser im Überschuß hinzu, so bekommt man stets nur eine gelbe Farbe. Man muß sich vorstellen, wie dies auch *Oppenheimer* tut, daß das Chlorwasser Br aus seinen Verbindungen frei macht, wodurch violettes Br-Fuchsin entsteht. Bei weiterem Chlorwasserzusatz wird das Br auch aus dieser Verbindung ausgetrieben, und es kommt zur Bildung von gelbem Cl-Fuchsin. Bei den relativ geringen Mengen, mit denen wir es zu tun hatten, genügte schon der Überschuß einiger Tropfen starken Chlorwassers, um die Br-Fuchsinbildung gar nicht zustande kommen zu lassen. Es erwies sich also als notwendig, das Chlorwasser *verdünnt* und ganz vorsichtig *tropfenweise* hinzuzufügen, und dabei nach dem unter 2. Gesagten zu bedenken, daß durch die zuerst anderweitige Bindung des Cl die Reaktion sehr hinausgezögert werden kann.

Bei Beobachtung aller dieser Kautelen gelang es uns, in *jedem* untersuchten *Blute* von Menschen, die sicher niemals Br zu sich genommen hatten, eine *eindeutige Br-Reaktion* zu erzielen. Wir standen somit vor der zwar nicht unerwarteten, aber immerhin sehr auffallenden Tatsache, daß das *normale menschliche Blut nennenswerte Mengen von Br* enthält.

Um Schlüsse über die etwaige Bedeutung des Br-Gehaltes zu ziehen, war eine Quantitätsbestimmung unerläßlich. Da von allen bekannten Methoden die oben beschriebene gravimetrische von *Fresenius* die exakteste ist, stellten wir zunächst einige Analysen damit an, trotzdem die Methode nur für größere Br-Mengen verwendbar ist. Wir benutzten zur Untersuchung etwa je 500 ccm menschlichen Blutes verschiedener Herkunft. Allerdings war vielleicht dadurch eine Fehlerquelle gegeben, daß bei den vorhandenen sehr großen Chlormengen das wenige Br durch den Chlorstrom nicht völlig ausgetrieben werden könnte. Wir gingen deshalb auch noch so vor, daß von den 500 ccm die Hälfte direkt

analysiert wurde, die andere Hälfte des Filtrats aber eingeengt, das Br durch Chlorwasser frei gemacht und mehrmals in Chloroform ausgeschüttelt wurde. Etwa gebildete Chlorbromverbindungen und Hypobromite wurden durch Zusatz von Natriumbisulfit zerstört, das abgelassene Chloroform mit Natronlauge versetzt (Bildung von NaBr) und dann ebenfalls analysiert. Die Veraschung erfolgte auf die eben beschriebene Art portionsweise.

Die derart erhaltenen Resultate stimmten relativ gut überein, besonders wenn man bedenkt, daß bei dem zuletzt erwähnten Analysengang mit Wahrscheinlichkeit geringe Br-Mengen verloren gehen mußten. Als Beispiel folge hier das gekürzte Protokoll einer solchen Paralleluntersuchung.

I. Analyse.

Direkte Bestimmung im Schmelzfiltrat von 300 ccm Vollblut.

(Austreibung des Broms durch den Chlorstrom):

AgCl + AgBr = 3,3426 g
AgCl + AgCl = 3,3399 g
Gewichtsabnahme 0,0027 g

$$\text{AgBr} = \frac{0{,}0027\ (\text{Mol.-Gew. AgBr})}{(\text{Mol.-Gew. AgBr}) - (\text{Mol.-Gew. AgCl})} = 0{,}01140\,\text{g}$$

Br = 0,00485 g = 4,85 mg = 1,61 mg-Proz.

II. Analyse.

Indirekte Bestimmung im Chloroformauszug von 300 ccm Vollblutschmelze.

(Austreibung des Broms durch den Chlorstrom):

AgCl + AgBr = 0,7621 g
AgCl + AgCl = 0,7601 g
Gewichtsabnahme 0,0020 g

$$\text{AgBr} = \frac{0{,}0020\ (\text{Mol.-Gew. AgBr})}{(\text{Mol.-Gew. AgBr}) - (\text{Mol.-Gew. AgCl})}$$

Br = 0,0036 g = 3,6 mg = 1,20 mg-Proz.

Aus den auf diese Weise erhaltenen, durch direkte und indirekte Analysen gesicherten Resultaten ergab sich also die Tatsache, daß der im *normalen menschlichen Blut* vorhandene *Br-Gehalt* etwa 1 bis 1,5 mg-Proz. beträgt. Ob dieser Wert unter normalen Verhältnissen noch weiter variiert, vermag erst eine sehr große Empirie sicherzustellen, über die wir zurzeit noch nicht verfügen. Eine gewisse Analogie dazu bieten die Resultate von *Damiens*, der im normalen Hundeblut 0,6 mg-Proz. Br fand.

Im Anschluß an die mitgeteilten Untersuchungen stellten wir uns nun die Aufgabe, eine leicht ausführbare quantitative Bestimmungsmethode auszuarbeiten, die es gestattete, den Br-Gehalt in klinisch zur Verfügung stehenden Blutmengen festzustellen. Denn die Annahme lag nahe, daß Br-Mengen von über 1 mg-Proz. im Blut keinen für den Organismus gleichgültigen Befund darstellen müßten, daß unter pathologischen Bedingungen Änderungen dieser Werte auftreten könnten, und daß das hier gefundene Br vielleicht den Ausdruck eines uns bisher unbekannten, bestimmt regulierten *Br-Stoffwechsels* darstellte. Von

den bisher bekannten, oben kurz beschriebenen Methoden kamen von vornherein nur diejenigen dafür in Frage, die mit bestimmten Br-Indikatoren arbeiteten, da die übrigen, wie schon erwähnt, eine Bestimmung von Bruchteilen von Milligrammen nicht gestatten. Es handelt sich also nur um eine quantitative Verwendung der Reaktionen von *Swarts-Baubigny*, von *Jolles* und von *Guareschi*. Da allein die *Guareschi*sche Methode bisher quantitativ ausgearbeitet ist (*Wünsche, Hartwich, Oppenheimer, Denigès* und *Chelle*), die Methode von *Baubigny* auch in der *Labat*schen Modifikation nicht so empfindlich wie diese ist, legten auch wir dem Br-Nachweis mittels des *Schiff*schen Reagenzes unseren Versuchen zugrunde. Eine Nachprüfung der *Wünsche*schen Methode erübrigte sich aus den schon oben angeführten Gründen, zumal ihre Grenze von 0,2 mg für uns doch noch nicht genügt hätte. Auch das Verfahren nach *Hartwich*, das uns an sich gute Resultate lieferte, ließ sich für Bestimmungen unter 1 mg nicht verwenden. Dagegen konnten wir mit der von *Oppenheimer* angegebenen Methode in wässerigen Bromalkalilösungen mit genügender Genauigkeit auch Bruchteile von Milligrammen feststellen, bei Bestimmungen im Schmelzfiltrat war ihre Durchführung aber nicht möglich. Denn die Chlorwassermengen, die zum Auftreten des Umschlagtones in der Bromsalzlösung und im Filtrate nötig sind, müssen bei gleichem Br-Gehalt verschiedene sein, da, wie erwähnt, die Reaktion im Blut stets eine erhebliche Verzögerung erleidet. Es war somit ein Vergleich im Sinne *Oppenheimers* zwischen Bromsalzlösung und Analysenlösung unmöglich. Mit der Methode von *Denigès* und *Chelle*, die uns nur in der Modifikation von *Lebeau* durch die Arbeiten von *Damiens* vorlag, konnten wir in größeren Mengen unseres Auszuges Br nachweisen. Bei kleinen Filtratmengen erhielten wir jedoch sofort einen gelben Farbton. Wir glauben, daß dies auf den Zusatz von konzentrierter Salzsäure zurückzuführen ist, wodurch die Bromfuchsinbildung nicht sichtbar wird. Beim Weglassen der konzentrierten Salzsäure und tropfenweisen Chlorwasserzusatz konnten wir auch bei kleineren Mengen eine violette Färbung des Chloroforms erzielen. Außerdem ergaben ausgedehnte Voruntersuchungen, über die weiter unten berichtet wird, daß ein kolorimetrischer Vergleich nicht durchführbar ist.

Da also für unsere speziellen Zwecke keine der bekannten Methoden anwendbar war, gingen wir selbst zur Ausarbeitung eines quantitativen Verfahrens nach dem Prinzip von *Guareschi* über. Zum Freimachen des Broms schien uns auch für kleinste Mengen der tropfenweise Zusatz von Chlorwasser am geeignetsten.

Zunächst kamen zwei Möglichkeiten in Frage:

1. Eine titrimetrische Methodik (die Violettfärbung geht bei weiterem Zusatz von Chlorwasser in Gelb über, siehe oben).

2. Eine kolorimetrische Methodik.

1. Langdauernde Versuche überzeugten uns, daß eine Titration unmöglich ist, wie dies auch schon *Oppenheimer* festgestellt hat. Einmal ist die Reaktionskinetik sehr langsam, ferner aber auch der Farbenübergang von Violett in Gelb völlig unscharf, so daß ein sicherer Umschlag bei gewöhnlichem Titrierverfahren nicht feststellbar war. Dazu kam noch die Schwierigkeit, daß bei den verschiedenen Schmelzauszügen der Beginn der Reaktion ein ganz verschiedener war, sich sogar bei demselben Auszug durch längeres Stehen veränderte. Bei derartig schwierig zu bestimmendem Anfang und Ende der Reaktion war also eine titrimetrische Bestimmung nicht durchführbar.

2. Eine kolorimetrische Bestimmung, die zunächst wegen der Intensität der Farben sehr aussichtsreich schien, erforderte eine Vergleichslösung. Eine Bromalkalilösung erwies sich als ungeeignet, weil im Verhältnis zum Blut bei gleichen Br-Mengen ihre Farbtiefe stets größer war. Auch eine von uns künstlich hergestellte Salzlösung (NaCl, Na_2CO_3 usw.) gab keine besseren Resultate. Es machte sich im Schmelzauszug immer eine gewisse Hemmung sowohl an Intensität als vielleicht auch an Quantität in der Farbreaktion geltend. Sogar der Versuch, als Vergleichslösung Filtrat von Blutschmelzen zu verwenden, dem eine bestimmte Menge NaBr zugesetzt wurde, führte uns nicht zum Ziel. Abgesehen von dieser Schwierigkeit, wäre es nötig gewesen, in der Reaktionskurve der Br-Fuchsinbildung einen bestimmten Punkt als Vergleichspunkt festzulegen. Denn wie mehrfach betont, verändert sich die violette Farbe parallel zum Chlorwasserzusatz. Es mußte also ein Farbvergleich bei ganz bestimmter Chlorwassermenge erfolgen, was ebenfalls nur bei einer Vergleichslösung möglich gewesen wäre, die genau die gleiche Reaktionsverzögerung aufwies, wie die Untersuchungsflüssigkeit.

Außerdem zeigte sich aber schon in einer einfachen wässerigen Bromalkalilösung, daß sowohl bei einem Vergleichspunkt im Beginn, auf der Höhe wie gegen Ende der Violettfärbung die Farbtiefe keineswegs in Parallele zur Br-Menge steht. (Selbstverständlich darf ein so großer Chlorwasserzusatz, daß bei der einen Lösung schon ein grauer oder braungelber Umschlagton erzeugt wird, nicht angewendet werden.) Irgendeine Gesetzmäßigkeit zwischen Br-Gehalt und Farbton konnten wir nicht erkennen, so daß wir auch auf ein kolorimetrisches Verfahren verzichten mußten, trotzdem Autoren wie *Wünsche* und *Denigès* und *Chelle* kolorimetrisch vorgegangen waren.

Nach den verschiedensten fehlgeschlagenen Versuchen kamen wir endlich dazu, die Br-Bestimmung als *Schwellenwerts*methode auszuarbeiten. Es ließ sich feststellen, daß erst bei ganz bestimmter Br-Konzentration die charakteristische Violettfarbe auftritt, und zwar

ergab sich bei unserer Versuchsanordnung in der Bromalkalilösung 0,05 mg Br als unterer Schwellenwert. Dieser Wert ist ziemlich exakt, wenn man sich auf eine natürlich ganz schwache, aber deutlich *violette* Farbe beschränkt und von einer bräunlichen Färbung abstrahiert, die bei geringerer Konzentration auftritt; dies gelingt bei einiger Übung leicht. Empfehlenswert ist es, eine angesäuerte, mit Indikator versetzte und durch Zusatz einiger Tropfen Chlorwasser gelblich gefärbte Wasserkontrolle als Vergleich zur Hand zu haben. Im normalen Blutfiltrat lag nun dieser Schwellenwert, wie wir an zahlreichen Analysen feststellen konnten, zwischen 4 und 5 ccm Vollblut. Obwohl wir uns bewußt sind, daß der Vergleich zwischen dem Schwellenwerte der Bromalkalilösung und dem des Blutfiltrats nicht ganz exakt ist (siehe oben), läßt sich doch wohl daraus annähernd schließen, daß in 4 bis 5 ccm Blut etwa 0,05 mg Br vorhanden sein müssen, was einem Br-Gehalt des Blutes von etwa 1 bis 1,25 mg-Proz. entsprechen würde. Die Zahlen stimmen gut mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen mit der *Fresenius*schen Methode überein. Die Genauigkeit der Schwellenwertsbestimmung reicht für klinische Zwecke sicher aus; es ist ein Fehler bis zu 1 ccm Blut möglich, was bei einem Br-Gehalt von 1,0 mg-Proz. eine Differenz von 0,25 mg-Proz. machen würde.

Unter Berücksichtigung der schon bei unseren qualitativen Untersuchungen erwähnten Tatsachen verläuft die Br-Bestimmung folgendermaßen:

25 ccm Oxalatblut werden im Nickeltiegel mit etwa 2 bis 3 g Ätznatron (oder Ätzkali) in oben angegebener Weise verascht, kurz geglüht, nach mehrstündigem Stehen bis zum völlig grauweißem Rückstand geglüht, mit Wasser von 40 bis 50^0 ausgezogen und filtriert. Schneller kommt man zum Ziele, wenn man dem Rückstand einige Tropfen Wasser zusetzt und dann nochmals glüht. Das Filtrat, das völlig farblos sein muß, wird auf 50 oder 100 ccm aufgefüllt. In ein kleines Kölbchen gibt man zunächst die 4 ccm Vollblut entsprechende Filtratmenge, fügt einen Tropfen Phenolphtalein zu, säuert mit 25 proz. Schwefelsäure bis zum völligen Austreiben der Kohlensäure an und neutralisiert scharf mittels Natronlauge. Darauf werden 0,7 ccm 25 proz. Schwefelsäure zugefügt, ferner 0,15 ccm des Indikators (über die Indikatorbereitung, die zur Erzielung eines genauen Schwellenwertes besonders wichtig ist, siehe unten). Man setzt zunächst zwei Tropfen Chlorwasser zu, schüttelt um und beobachtet die Farbe. In dieser Weise fährt man fort — dabei zwischen den Chlorwasserzugaben mindestens 1 Minute verstreichen lassen und gut schütteln —, bis eine Farbenänderung eintritt. Als Kontrolle benutzt man ein Gefäß mit destilliertem Wasser, eine Leerbestimmung in Wasser, die einen gelblichen Farbenton annimmt und eine schwach violette Bromfarbe (z. B. Bestimmungen in

0,07 bis 0,1 mg Br). Ist in der Filtratmenge genügend Brom enthalten, so zeigt sich eine, wenn auch ganz schwache, doch deutlich violette Farbe, im anderen Falle geht die Farbe langsam in einen gelben, gelblichroten oder gelblichbraunen Farbenton über.

Es schließen sich je nach dem Ergebnis die Bestimmungen in der 3 oder 5 ccm Blut entsprechenden Filtratmenge an. Auf diese Art gelingt es bald, den Schwellenwert zu finden, den man meist auf 0,5 ccm Blut genau festlegen kann.

Beispiel.

25 ccm Oxalatblut verascht, geglüht, ausgezogen; Filtrat klar auf 100 ccm aufgefüllt.

16 ccm Filtrat (= 4 ccm Blut) ergeben gelbe Farbe, bei der ersten Farbänderung zeigt sich ein etwas rötlicher Ton, jedoch kein Violett.

20 ccm Filtrat (= 5,0 ccm Blut) ergeben schwach, aber deutlich violette Farbe, die etwa beim achten Tropfen Chlorwasser auftritt und nach weiterem Chlorwasserzusatz bald in Gelb übergeht.

18 ccm Filtrat (= 4,5 ccm Blut) ergeben kein Violett.

Resultat.

20 ccm Filtrat (= 5,0 ccm Blut) haben sich als Schwellenwert ergeben, entsprechen also 0,05 mg Brom; demnach enthält das Blut 1,0 mg-Proz. Br.

In Fällen, wo wir nach Brommedikation das Blut untersuchten, gingen wir natürlich gleich von vornherein von bedeutend kleineren Blutmengen aus.

Notwendige Reagenzien.

1. Bromfreies destilliertes Wasser.
2. 25proz. Schwefelsäure.
3. 33 proz. reine Natronlauge.
4. Offizinelles Chlorwasser, das wir in der Verdünnung 1:5 anwandten.
5. Reines Ätznatron oder Ätzkali.
6. Phenolphtalein (1 proz. alkohol. Lösung).
7. Indikator: 100 mg ganz fein gemörsertes, reines Fuchsin werden in 100 ccm dünner schwefliger Säure in der Wärme (etwa 60°) gelöst und 24 Stunden im Eisschrank stehengelassen. Es ist dann das Fuchsin völlig gelöst und die Flüssigkeit bis auf einen schwach gelblichen Farbenton entfärbt.

Herstellung der schwefligen Säure: In einem Kölbchen (unter dem Abzug) macht man mit Natriumbisulfit und Schwefelsäure (konzentriert) SO_2 frei und leitet es in Wasser ein. Zum Auflösen des Fuchsins verwendet man eine SO_2-Lösung, von der 1 ccm 0,5 bis 0,6 ccm n/10 NaOH gegen Phenolphtalein verbraucht. Der fertige Indikator, den man zur Kontrolle noch einmal gegen n/10 NaOH ohne Indikatorzusatz titrieren

kann, verbraucht pro Kubikzentimeter etwa 0,2 ccm n/10 NaOH bis zur ausgesprochenen Rotfärbung.

Der Indikator muß eine ganz bestimmte Stärke an schwefliger Säure haben, da zuviel schweflige Säure die Feinheit der Reaktion vermindert. Bei zu wenig schwefliger Säure gibt der Indikator stets einen rötlichen Farbenton, der das Erkennen des Violetts erschwert. Der Indikator hält sich etwa 8 bis 14 Tage im Eisschrank, muß aber vor jeder Untersuchung durch eine Leerbestimmung kontrolliert werden (destilliertes Wasser + 0,7 ccm 25 proz. H_2SO_4 + 0,15 ccm Indikator + einige Tropfen Chlorwasser). Es muß sich sofort ein gelblicher Farbenton einstellen; tritt Rotfärbung ein, so ist der Indikator nicht mehr brauchbar.

8. Als Standardlösung eine Lösung von 0,1489 g Kaliumbromid (*Kahlbaum*) auf 1 Liter bromfreies destilliertes Wasser. Es enthält dann 1 ccm dieser Lösung 0,1 mg Br (in dieser Lösung fanden wir 0,5 ccm (= 0,05 mg Br) als den Grenzwert bei der von uns angegebenen Anordnung).

Alle Chemikalien, besonders auch das Wasser, sind vor Benutzung auf Brom zu prüfen. Wir konnten die Angabe *Guareschis* bestätigen, daß sich Brom sehr oft als Beimengung in den Chemikalien findet. Besonders die Chloride sind nur selten davon frei.

Erwähnt sei noch, daß wir unsere Reaktion auch im Scheidetrichter mit Chloroformzusatz vornahmen und ausschüttelten. Die Reaktion ist dabei zwar empfindlicher, d. h. der Schwellenwert liegt tiefer, ist aber nicht so exakt festzulegen, weil das Chloroform auch bei Spuren von Brom eine rötliche Verfärbung zeigt, die schwer von der schwach violetten Farbe oberhalb des Schwellenwertes (bei dieser Methodik etwa 0,006 mg Br) abgrenzbar ist.

Zusammenfassung.

Wie sich durch eine Zusammenstellung der Bromliteratur zeigen läßt, bestehen keine sicheren Angaben über den normalen Bromgehalt des menschlichen und tierischen Organismus (siehe auch *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, Aufl. 1924). Unsere aus diesem Grunde unternommenen Untersuchungen über einen etwaigen Bromgehalt des Blutes führten zu dem Ergebnis, daß das Blut von Menschen, die sicher niemals Brom zu sich genommen haben, einwandfrei Brom enthält.

Der Nachweis geschah zunächst qualitativ nach *Guareschi* im Aschenfiltrat. Quantitative Bestimmungen mit der bekannten indirekten Methode, sowie mit einer von uns ausgearbeiteten Methodik nach dem *Guareschi*schen Prinzip ergaben mit guter Übereinstimmung einen Wert

von etwa 1,0 bis 1,5 mg-Proz. Br. Es wird weiter die genaue Methodik beschrieben, wie in klinisch zur Verfügung stehenden Blutmengen der Br-Gehalt als Schwellenwert mit zunächst ausreichender Genauigkeit bestimmt werden kann.

Weitere Untersuchungen über pathologische Befunde, den Bromgehalt der Organe und über die Verteilung im Blute sind im Gange.

Literatur.

Alday Redonnet, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **84**, 339, 1919. — *Authenrieth*, Münch. med. Wochenschr. **65**, 33, 1918. — *Baldi*, Arch. ital. de Biol. **29**, 353, 1898. — *Baubigny*, C. r. **125**, 1897. — *Baubigny* und *Rival*, ebendaselbst **124** und **125**, 1897. — *Baur* und *Oppenheimer*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **94**, 1922. — *Berglund*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **24**, 1885. — *Bernoulli*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **73**, 355, 1913. — *Bill*, zitiert nach *Hondo*. — *Bogdandy*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **84**, 11, 1913. — *Bönniger*, Zeitschr. f. exper. Path. u. Therap. **4**, 414, 1907. — *Büchner*, Dissertation Würzburg 1898. *Damiens*, C. r. des séances de l'Acad. des sciences **171**, 1920. — *Denigès* et *Chelle*, ebendaselbst **155**, 1912; Bull. Soc. de Pharm. de Bordeaux **55**, 1917. — *Ellinger* und *Kotake*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **65**, 87, 1911. — *v. Fellenberg*, Mitt. aus d. Gebiet d. Lebensmittelunters. u. Hyg. **14**, H. 4, Bern 1923. — *Fessel*, Münch. med. Wochenschr. 1899, S. 39. — *Fresenius*, Quantitative Analyse **1**, 288. — *Frey*, Zeitschr. f. exper. Path. u. Therap. **8**, 29, 1910. — *Gensler*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **77**, 164, 1914; **79**, 42, 1916. — *Guareschi*, Fresenius' Zeitschr. f. analyt. Chem. **52**, 454, 538, 609, 1913. — *G. Hartwich*, diese Zeitschr. **107**, 202, 1920. — *Hondo*, Berlin. klin. Wochenschr. 1902, S. 10. — *Jolles*, Wien. klin. Rundschau 1898, S. 12. — *Justus*, Virchows Arch. **190**, 524, 1907. — *Kottmann*, Schweiz. med. Wochenschr. 1920, Jahrg. 50. — *Labat*, Dissertation Bordeaux 1912 (zitiert nach *Pillat*). — *Lorenz*, *Grau* und *Bergheimer*, Zeitschr. f. anorgan. u. allgem. Chem. **136**, 1924. — *Markwalder*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **81**, 130, 1917. — *Merke*, Schweiz. med. Wochenschr. 1921, Jahrg. 51, S. 200. — *Mörner*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 138, 1913. — *Nencki* und *Schoumow-Simanowsky*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **34**, 312, 1894. — *Oppenheimer*, ebendaselbst **89**, 17, 1921. — *Pribram*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **49**, 457. — *Paderi*, Soc. med. chir. di Pavia. u. Riforma medica, 5. Ausgabe, 1898, nach *Justus*. — *Pflaumer*, Dissertation Erlangen 1895. — *Pillat*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **108**, 158, 1919. — *Rabuteau*, Éléments de Toxilogie, S. 759. Paris 1873. — *Redlich*, *Pölzl* und *Hess*, Zeitschr. f. d. ges. Neur. u. Psychol. **2**, 715, 1910. — *Rosenthal*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**. — *Rotky*, Zeitschr. f. klin. Med. **75**, 494, 1912. — *Speckeler*, Zeitschr. f. Elektrochem. **4**, 1898. — *Swarts*, Bull. Acad. de Belgique **17**, 359, 1889; zitiert nach Jahresber. f. Chem. 1889, S. 2329. — *Walter*, Zeitschr. f. d. ges. Neur. u. Psychiol. **47**, 380, 1919. — *Weszelszky*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **39**, 81, 1900. — *Wünsche*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **84**, 328, 1919. — *v. Wyss*, ebendaselbst **55**, 263, 1906; **59**.

Berichtigung.

In der Mitteilung von *M. Kondo*, diese Zeitschr. **150**, 338, Zeile 6 von unten lies: „unter Bildung einer Substanz" statt **an eine Substanz.**

Biochemische Zeitschrift

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertfünfundfünfzigster Band

Drittes und viertes Heft

Ausgegeben am 14. Februar 1925



Berlin
Verlag von Julius Springer
1925

155. Band. Inhaltsverzeichnis. Heft 3/4.

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Die quantitative Untersuchung biologischer Flüssigkeiten auf Substanzen mit starker Oberflächenaktivität.

Von

R. Brinkman und **J. v. d. Velde.**

(Aus dem physiologischen Institut der Reichsuniversität in Groningen.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1924.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Es ist wahrscheinlich, daß den biologisch vorkommenden, stark oberflächenaktiven Substanzen wie höheren Fettsäuren, Cholaten und großmolekularen Eiweißspaltprodukten eine große Bedeutung zukommt, gerade durch ihre Neigung zur Grenzflächenkonzentrierung und den sich daraus ergebenden Einfluß auf Kolloiddispersität, Membranpermeabilität usw. Bis jetzt ist jedoch nur wenig Brauchbares auf diesem Gebiete festgestellt worden, und deshalb haben wir versucht, ob nicht eine Methodik, welche für die fragliche Untersuchung besser geeignet ist als die bis jetzt verwendete, etwas mehr Resultate ergeben könnte.

Methodisch ist die wichtigste Aufgabe die Untersuchung der Oberflächenaktivität der im Blute gelösten Substanzen bzw. die Bestimmung der Oberflächenspannung des Blutes. Dabei kommt als gut definierbare Größe nur die sogenannte *statische* Oberflächenspannung in Betracht, d. h. also diejenige Tension, welche bei Gleichgewicht zwischen den Konzentrationen in der Oberfläche und im Innern der Lösung besteht. Halbdynamische Spannungsergebnisse, wie sie z. B. bei kolloidalen Flüssigkeiten mit Tropfenzahlmethoden gefunden werden, sind schwierig interpretierbar: nur wenn die Tensionserniedrigung durch schnell diffundierende Substanzen, wie Essigsäure, bedingt wird, sind statische und dynamische Spannung einander gleich und ist die stalagmometrische Methode anwendbar.

Von den statischen Methoden für biologische Oberflächenspannungsbestimmungen ist das Verfahren des Adhäsionsringes weitaus überlegen[1]; sie gestattet die genaue Messung der Tensionserniedrigung durch monomolekulare Schichten der kapillaraktiven Substanz, welche,

[1]) Bestimmung mit einer Torsionswage. Literatur: *Lec. du Nouy*, Journ. gen. Physiol. **1**, 621, 1919; *R. Brinkman* und *E. van Dam*, Münch. med. Wochenschr. 1921, S. 1550; *T. Tominaga*, diese Zeitschr. **140**, 230, 1923. Komplette Apparatur bei *Hartmann* und *Braun* A.-G., Frankfurt a. M.

stalagmometrisch gemessen, vollkommen unbemerkbar bleiben bei diesen immer großmolekularen Substanzen. Vergleicht man z. B. nach *Tominaga*[1]) die Oberflächenspannung verdünnter Oleatlösungen mit einem Stalagmometer (Tropfenzahl 53,6) und mit der Adhäsionsmethode, bei gleicher Temperatur gemessen, so zeigt sich folgendes (Abb. 1).

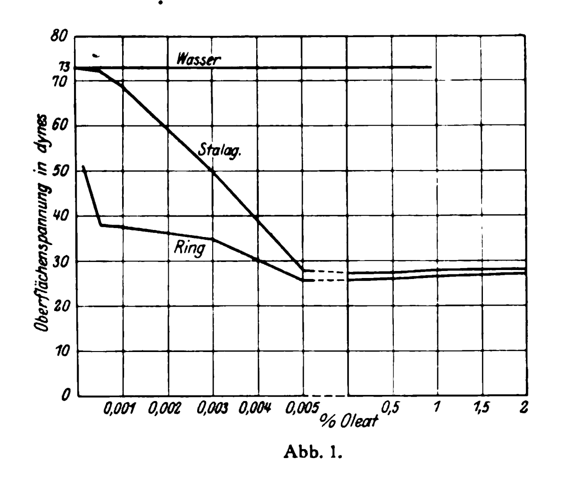


Abb. 1.

Die Oberflächenspannung des Wassers ist 73 Dyne/cm. Die anfänglich auftretende Spannungserniedrigung mit der Verdünnung ist durch hydrolytische Spaltung der Seife bedingt.

In einer 0,001 proz. Seifenlösung ist also stalagmometrisch keine Spannungserniedrigung mehr auffindbar, während die statische Messung noch eine Verminderung von 22 Dynen anzeigt. Bei stärker konzentrierten Lösungen findet man mit der Tropfenzahlbestimmung ungefähr den statischen Wert; die wirklich dynamische Spannung ist mehr als zweifach größer (Methode der schwingenden Strahlen).

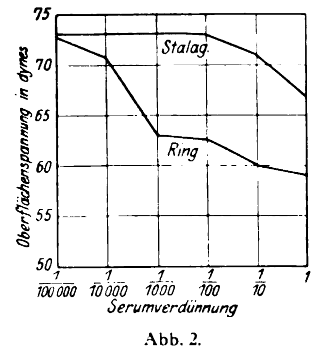


Abb. 2.

Dieselbe Erscheinung findet man bei der Messung der Oberflächenspannung von Sera und ihren Verdünnungen. Nach den Untersuchungen *Tominagas*[2]) wird diese Größe bedingt durch eine sehr kleine, nicht diffusible Menge höherer Eiweißspaltprodukte und sicher nicht durch die Eiweißstoffe; von vornherein ist es also wenig wahrscheinlich, daß ihre Oberflächenaktivität durch die strömende Tropfenoberfläche bestimmt werden kann. In Abb. 2 sind wieder Vergleichswerte von stalagmometrischer und Ringmethode angegeben.

Hier zeigt sich also die Unbrauchbarkeit der Tropfenzahlmethode für die Bestimmung der Oberflächenspannung des Serums und natürlich auch für die Messung etwaiger Änderungen.

---

[1]) *T. Tominaga*, l. c.
[2]) *Derselbe*, diese Zeitschr. 141, 248. 1923.

Nur wenn eine Erniedrigung durch relativ schnell diffundierende Substanzen verursacht wird, ist eine Anwendung der stalagmometrischen Methodik möglich, wie das z. B. bei der Verfolgung der Tributyrinspaltung durch Serum nach *Rona* und Mitarbeitern geschieht. Hier bietet sie sogar den Vorteil, daß die beträchtliche Tensionserniedrigung durch das verdünnte Serum selbst unmerkbar bleibt, so daß die Oberflächenspannung nach der Esterspaltung scheinbar fast auf den Wasserwert ansteigen kann. Auch bei der Untersuchung der Adsorption schnell diffundierender Substanzen an hydrophile Kolloide (z. B. Buttersäure an Stärke oder Gelatine) hat eine Tropfenzählmethode mit schnell fließenden Tropfen dieselben Vorteile[1]). Wenn es aber auf genaue

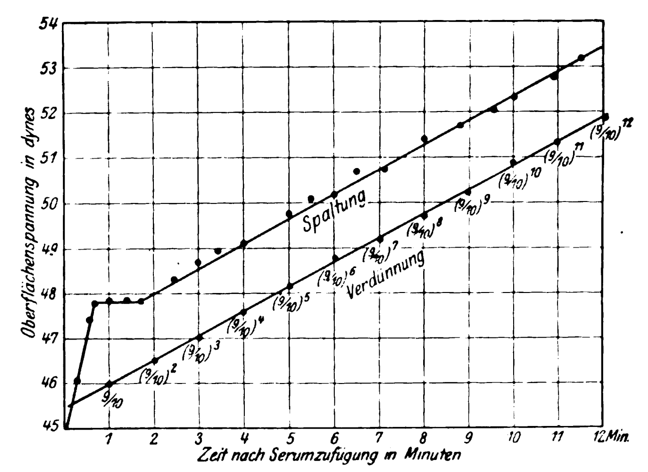


Abb. 3. Ablesung der Tributyrinspaltung.
Untere Linie: Konzentration — Oberflächenspannungskurve einer verdünnten Tributyrinlösung. Obere Linie: Oberflächenspannungssteigerung derselben Lösung durch 10 proz. Kaninchenserum bei p_H 7,8.

und schnelle Messung der Tributyrinspaltung durch kleine Serummengen ankommt, ist auch hier die Methode der Torsionswage weit überlegen. Als Beispiel geben wir Abb. 3 nach den Versuchen von Herrn cand. med. *M. Russchen.*

Für das Studium kapillarchemischer Prozesse bei biologischen Vorgängen wie bei immunologischen Reaktionen[2]) (Anaphylaxie, Meiostagminreaktion) ist aber die halbdynamische Stalagmometermethode nicht brauchbar, obwohl sie bis jetzt fast ausschließlich benutzt wurde. Wenn man z. B. bei *Kopaczewski*[3]) die Oberflächenspannung

[1]) Siehe z. B. *Lasnitzky* und *Farmer Loeb*, diese Zeitschr. **146**, 96, 1924.
[2]) Literatur bei *Friedberger* und *Putter*, Zeitschr. f. Immunf. **36**, 215, 1923.
[3]) *Kopaczewski*, Arch. int. d. Physiol. **20**, 1922. Noch höhere Werte, mit demselben Instrument gemessen, findet man bei *Zunz* und *La Barre*, Arch. Int. Physiol. **21**, 361, 1923.

des doppelt verdünnten Blutes auf 70,25 Dynen angegeben findet, während sie bei statischer Messung nur ganz wenig von der Spannung des unverdünnten Blutes (55 bis 57 Dynen) verschieden ist, wird es einleuchten, daß eine eventuell gefundene Erniedrigung meistenfalls gar nicht von einer kapillaraktiven Grenzflächenänderung, sondern von einem nicht genau zu analysierenden Einfluß auf die Diffusionsgeschwindigkeit in die sich immer erneuernde Grenzschicht herrühren muß. Und umgekehrt, wenn sich z. B. bei einer Immunreaktion wirklich eine kapillaraktive Substanz, welche wohl immer größermolekular sein wird (Albumosen, Peptone, Fettsäuren), in kleinen Mengen im Blute befände, so würde eine Tropfenzahlmethode nicht imstande sein, ihre Anwesenheit aufzudecken, wie das aus den Abb. 1 und 2 hervorgeht.

Da mit jeder Oberflächenspannungsmessung nur die freien und nicht die an Plasma- oder Körperchenkolloide gebundenen stark aktiven Substanzen bestimmt werden können, wird eine für das Blut geeignete Methode imstande sein müssen, außerordentlich kleine Mengen dieser Stoffe quantitativ zu studieren, denn das Bindungsvermögen der Blutkolloide für sie ist sehr groß, wenigstens bei Zimmertemperatur, bei welcher die Versuche fast immer stattfanden. Man kann bekanntlich ganz beträchtliche Mengen Seifen, Cholate, Peptone usw. im Plasma lösen, ohne große Änderung der statischen Oberflächenspannung. Sofort nach der Zufügung ist sie erniedrigt, wenige Augenblicke nachher aber wieder auf den Originalwert angestiegen. Die Abb. 4 und 5 mögen noch einmal eine Illustrierung dieses wichtigen Verhaltens geben.

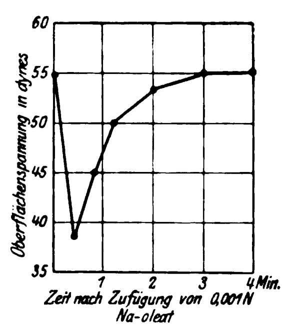


Abb. 4. Zeitliche Erniedrigung der Oberflächenspannung des Serums (Kaninchen) bei 18° durch einmalige Zufügung von 0,001 N. Na-oleat.

Ganz analoge Erfahrungen hat auch *du Nouy* gemacht bei der Zufügung kapillaraktiver Substanzen zu Serum in vitro[1]).

Und auch bei intravenöser Injektion von Seifen und Messung der Oberflächenspannung des Blutes nach der Einspritzung bei Zimmertemperatur gelingt es bei erträglichen Dosen nicht, eine Erniedrigung dieser Tension festzustellen. *Es ist dann auch wohl mit Sicherheit anzunehmen, daß eine bedeutende, etwas länger andauernde physiologische, pathologische oder experimentelle Beeinflussung der Oberflächenspannung Blut—Luft nicht durch in vivo noch erträgliche Mengen einer starkaktiven Substanz verursacht werden kann.*

[1]) *P. Lecomte du Nouy*, Science 60, 337, 1554, 1924.

Will man nun doch den Versuch machen, eine Änderung in der Konzentration oder Beschaffenheit der stark kapillaraktiven Substanzen des Blutes nachzuweisen, so muß man ihre Bindung an die Blutkolloide (Adsorption) herabsetzen bzw. die noch reversible Bindung wieder lösen. Jedenfalls ist es deshalb angezeigt, eine Messung so schnell wie möglich nach der erwarteten Änderung vorzunehmen. Und weiter ist die Temperatur hier von großer Bedeutung; bekanntlich erniedrigt sich die Oberflächenspannung einer reinen Flüssigkeit etwas mit der Temperatur, aber der Einfluß dieses kleinen Temperaturkoeffizienten (für Wasser 0,002) wird weit übertroffen durch den negativen Temperaturkoeffizienten der Adsorptionsgeschwindigkeit. Vergleichung der Oberflächenspannung des Kaninchenserums bei 18° und bei 37° zeigt das deutlich. Bei 18° beträgt sie im Mittel 56 Dynen, bei 37° 48 Dynen; die bloße Verringerung der Wasseroberflächenspannung durch diese Temperatursteigerung würde nur 2 Dynen betragen.

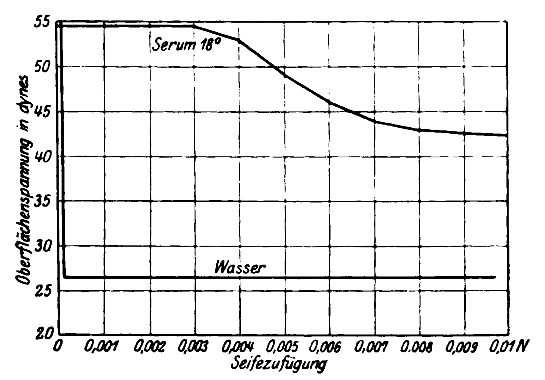


Abb. 5. Einfluß einer steigenden Seifenkonzentration auf die Oberflächenspannung des Serums und des Wassers.

Man könnte nun vielleicht auch erwarten, daß eventuelle Änderungen in der Menge oder Konstitution der kapillaraktiven Substanzen sich besser auffinden lassen, wenn das Blut während der Entnahme und Messung immer auf Körpertemperatur bleibt. Folgende Tabelle zeigt vergleichend das Verhalten desselben frischen Kaninchenblutes zu einer beigefügten Oleatlösung, wenn das Serum immer auf Körpertemperatur bleibt.

Frisches Kaninchencitratblut (4 Vol. Blut + 1 Vol. 3proz. Na-Citrat). Oberflächenspannung sofort gemessen 59 Dynen, nach 10 Minuten 55 Dynen; bei 35° 48 Dynen.

+ Oleat	1 Min. nach Zufügung		Nach 5 Min.		Nach 15 Min.		Nach 30 Min.	
	bei 20° C	bei 35° C	bei 20° C	bei 35° C	bei 20° C	bei 35° C	bei 20° C	bei 35° C
0,001 N . . .	55	40	55	41	55	43	54	48
0,002 N . . .	55	39	55	39	55	43	54	48
0,003 N . . .	54,5	39	55	40	55	42	54	47

Die Tensionserniedrigung durch Na-Oleat bei Zimmertemperatur ist nur kürzer als 1 Minute auffindbar (vgl. Abb. 4), bei 35° bleibt sie 5 bis 15 Minuten bestehen.

Es ist hierbei aber noch zu betonen, daß diese zeitliche Erniedrigung nur von sehr stark kapillaraktiven Substanzen, wie Seifen und Cholate, gegeben wird. Substanzen mit großer biologischer Bedeutung, wie die Peptone, welche nicht so erheblich kapillaraktiv sind, können selbst bei Zufügung in größeren Konzentrationen die Oberflächenspannung nicht unter 55 Dynen herabsetzen, auch nicht wenn bei 37° gemessen wird. Das rührt vielleicht auch daher, daß die Oberflächenspannung des normalen Blutes von peptonartigen Substanzen selbst verursacht wird[1]) und die Oberfläche schon normalerweise hiermit gesättigt erscheint. Konzentrierung des Blutes oder des metaphosphorsauren Filtrats[1]) bedingt keine weitere Erniedrigung der Spannung. Damit erscheint auch eine biologische Erniedrigung der Tension durch diese Substanzen fast unmöglich.

Da die Untersuchung des unverdünnten Serums also nicht sehr geeignet ist, versuchten wir noch, ob nicht eine starke Verdünnung des Blutes oder Serums mit reinem Wasser den Nachweis kapillaraktiver Änderungen empfindlicher machen würde. Die Hypothese hierbei war, daß man die Blut—Luftoberfläche im Verhältnis zu der Blutkolloidgrenzfläche relativ stark erhöhen konnte durch beträchtliche Verdünnung des Blutes, und weiter, daß eine Tensionserniedrigung durch sehr kleine Substanzmengen sich besser an einer hohen Anfangsspannung als an einer schon ziemlich stark erniedrigten nachweisen läßt. Von *du Nouy*[2]) ist diese Methode zum Nachweis von Immunsubstanzen im Serum benutzt worden; bei seiner „time-drop"-Bestimmung wird die Differenz der Oberflächenspannung des 10000fach verdünnten Serums sofort nach der Verdünnung und 2 Stunden nachher gemessen. *Du Nouy* hat in dieser Weise eine Zunahme des „time-drop" bei Immunitätsreaktionen gefunden; allerdings beruhen seine Resultate, soweit wir sehen, nicht auf wirklicher Erniedrigung des statischen Wertes, sondern auf Erhöhung des Anfangswertes.

Daß mit dieser Verdünnungsmethode eine Vermehrung der kapillaraktiven Substanzen des Serums etwas deutlicher gefunden werden kann, ist sehr wahrscheinlich, wie es folgende Tabelle anzeigt. Allerdings muß die Verdünnung 1 bis 2 Minuten nach der Zufügung der gesuchten Substanz vorgenommen werden, und wird bei verschiedenen Substanzen das Resultat von deren verschiedener Bindungsgeschwindigkeit abhängen.

Zu 10 ccm frischen Kaninchenserums bei 18° (Oberflächenspannung 56 Dynen) fügt man n/1000 Na-Oleat, sorgt für eine gleichmäßige Mischung und verdünnt 0,1 ccm des Seifenserums auf 1 Liter im Meß-

[1]) *T. Tominaga*, diese Zeitschr. **141**, 248, 1923.
[2]) *Lec. du Nouy*, Journ. exper. Med. **37**, 659, 1923.

zylinder mit Leitungswasser. Hierbei muß Schaumbildung immer vermieden werden, weil sonst öfters die meisten kapillaraktiven Substanzen im Schaum irreversibel gebunden werden. Vergleichung mit $^1/_{10000}$ Normalserum zeigt folgendes (statische Oberflächenspannung nach einer halben Stunde gemessen):

$^1/_{10000}$ Normalserum	70,5
$^1/_{10000}$ (Serum + n/1000 Seife)	66,5

In dieser Weise kann es also gelingen, eine Vermehrung des Blutes an kapillaraktiven Substanzen nachzuweisen, und wir konnten mit dieser Methode zeigen, daß der Gehalt des Blutes an kapillaraktiven Substanzen unmittelbar nach der Vagusreizung zugenommen hat. Man muß hierbei aber sehr schnell und sauber arbeiten, und auch dann gelingt der Nachweis nicht immer; quantitative Ansprüche hat die Methode gar nicht.

Wir beschreiben deshalb im folgenden eine neue Methode für die Untersuchung des Blutes auf kapillaraktive Substanzen, welche wir für aussichtsreicher halten.

Quantitative Bestimmung sehr kleiner Mengen stark kapillaraktiver Substanzen mittels direkter Messung ihrer Ausbreitungsoberfläche in monomolekularer Schicht.

Aus den bekannten Arbeiten über monomolekulare Oberflächenschichten von *Langmuir*, *Devaux*, *Marcelin*, *Adam* usw. weiß man, daß, wenn sich sehr wenig kapillaraktive Moleküle in der Wasseroberfläche wie in einer zweidimensionalen Gasphase bewegen, diese mit sehr kleinem Druck zu einer „flüssigen“ oder „festen“ Phase zusammengeschoben werden können, daß aber in diesem Augenblick, wo eine Monomolekularschicht entstanden ist, der Druck notwendigerweise für weitere Oberflächenverkleinerung sehr viel größer wird. Daraus ergibt sich eine einfache Methode zur quantitativen Untersuchung auf sehr kleine Mengen stark kapillaraktiver Substanzen, welche Methode sich für die diesbezügliche Untersuchung des Blutes als viel brauchbarer herausstellte als die Oberflächenspannungsmessung. Sie ist dabei viel empfindlicher, weil eine Substanzmenge, welche für die Bildung einer Monomolekularschicht nicht mehr ausreicht, durch Oberflächenspannungsbestimmung nicht aufgedeckt werden kann, während die neue Methode der direkten Oberflächengrößenbestimmung der Adsorptionsschicht gerade eine kleinere Konzentration als diese zur Voraussetzung hat.

Wir haben folgende einfache Anordnung konstruiert (s. Abb. 6).

Ein niedriges, rechtwinkliges gläsernes Schälchen (1). Innenlänge 14,5 cm, Innenbreite 6,3 cm, Innenhöhe 1,2 cm, Wanddicke 0,3 cm, mit gut parallelen und oben sauber flachgeschliffenen Wänden (Deckel einer

gläsernen Schachtel für steriles Katgut, beigeschliffen), wird in rauchender Salpetersäure fettfrei gemacht und danach nur mit der Pinzette oder mit baumwollenen Handschuhen (2) berührt. Es wird ganz mit Leitungswasser gefüllt, bis das Wasser allseitig überfließt. Dann wird ein genau passender, 1 cm breiter Streifen sehr dünnen Pergamentpapiers quer über die Wasseroberfläche gelegt (4), so daß die Glaswand beiderseits noch gerade nicht berührt wird, aber die Spalte zwischen Papier und Wand beiderseits nicht breiter als ½ mm ist. Das gelingt sehr leicht, wenn man sich einmal die richtige Papierlänge ausgesucht hat. In der Längsrichtung des Papierchens ist an der Obenseite ein gerader Stahldraht mit sehr wenig Celluloid-Acetonlösung festgeklebt.

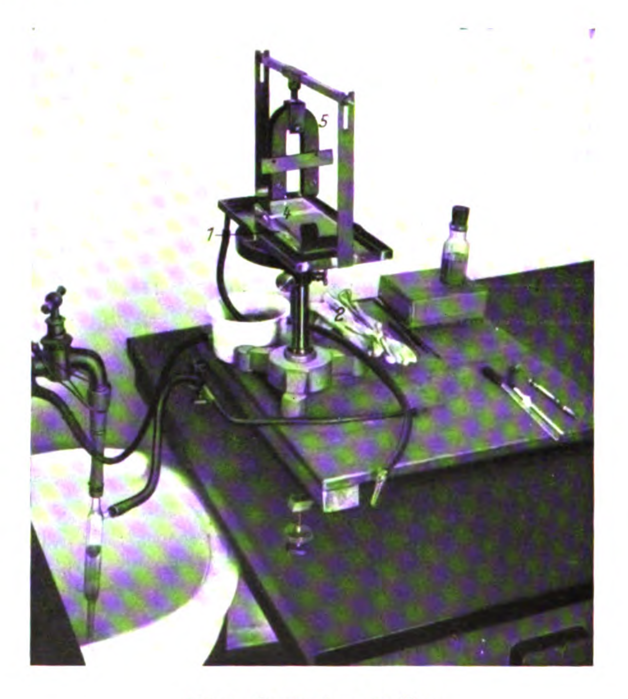


Abb. 6. Beschreibung im Text.

An einem viereckigen Kupferstab ist, mit Schlitten befestigt, auf 2 cm Höhe über der Wasseroberfläche ein ziemlich starker permanenter Stahlmagnet (5) verschiebbar, mit dessen Hilfe man den querliegenden Papierstreifen mit aufgeklebtem Stahldraht über die Wasseroberfläche gleiten lassen kann. Das Glasschälchen ist auf einer umrandeten Kupferplatte aufgestellt, so daß das überfließende Wasser bequem entfernt wird.

Für definitive Untersuchungen verwenden wir einen gleichgebauten Apparat, wobei auf der Kupferplatte aber zwei gleichartige Schälchen hintereinander stehen und der Magnet über beide Schälchen reiten kann, so daß immer Doppelbestimmungen ausgeführt werden können.

Ist das Wasser ganz rein, so gleitet das Papierstreifchen mit Stahldraht unter dem verschiebenden Magnet ganz glatt über die Ober-

fläche; sobald aber etwaige kapillaraktive Moleküle zu einer festen monomolekularen Schicht zusammengeschoben sind, bleibt das Papierchen plötzlich wie gegenüber einer Sperre stehen und kann vom Magnet nicht weitergezogen werden. Schiebt man den Magnet und also auch das angezogene Papierchen wieder nach der „reinen" Seite zurück und drückt noch einmal zusammen, so soll der Streifen an genau derselben Stelle (auf $\frac{1}{4}$ cm der Längenrichtung genau) gesperrt bleiben.

Es kann bisweilen vorkommen, daß bei zu kurzem Papierstreifen das Papierchen im Augenblick des Zusammendrückens der Molekularschicht schräg ausweicht und einen Molekularstrom entweichen läßt. Diese Moleküle kann man dann an der anderen Seite des Schälchens zusammendrücken oder sie auch mit Hilfe des Papierchens wieder nach der ersten Seite drücken. Ist die ganze Oberfläche mit einer Monomolekularschicht bedeckt, so ist das Papierchen unbeweglich.

Daß der Augenblick, in dem beim Zusammendrücken die feste Molekularschicht auftritt, nicht allmählich, sondern plötzlich erfolgt, wie es in den Versuchen *Langmuirs* und der Anwendung der Phasengleichgewichtslehre im zweidimensionalen Raume durch *Ehrenfest*[1]) sich herausstellt und aus der momentanen Sperrung des Papierchens zu ersehen ist, läßt sich noch deutlich zeigen, wenn man die Oberflächenspannung in einer immer kleiner werdenden Wasseroberfläche bestimmt. Der an der Torsionswage hängende Adhäsionsplatinring wird auf die Wasseroberfläche ± 2 cm von der einen Seite des Schälchens gestellt und eine so starke Torsion hervorgerufen, daß eine Erniedrigung der Oberflächenspannung um $^1/_2$ Dyne die Zerreißung des gehobenen Wassersäulchens verursachen wird. Jetzt wird das Papierchen von der anderen Seite aus vorsichtig über die Wasseroberfläche gezogen, so daß die kapillaraktiven Moleküle (z. B. Fettsäuremoleküle) immer mehr zusammengedrückt werden; der Ring löst sich erst in genau demselben Augenblick, wo das Papierchen gesperrt wird. Bekanntlich tritt eine wahrnehmbare Tensionserniedrigung erst ein, wenn wenigstens eine monomolekulare Schicht an der Oberfläche adsorbiert ist; diese Schicht ist also in dem Moment der Sperre plötzlich entstanden.

Die Tensionserniedrigung für eine monomolekulare Fettsäureschicht ist 1,9 Dyne, für Cholate 1,9, für Peptone 1,7 und für Blut 1,7 Dyne.

Die *Blut*untersuchung auf stark kapillaraktive Substanzen machten wir in folgender Weise. In nicht verdünntem Zustande kann das Blut nicht untersucht werden, weil die kleinste noch abmeßbare Menge, 0,1 mg, noch eine zu große Monomolekularschicht ergibt. Am bequemsten ist eine $^1/_{200}$ bis $^1/_{400}$ Verdünnung mit Wasser, wobei natürlich

[1]) *P. Ehrenfest*, Rec. Trav. Chim. Pays Bas., 4. Serie, T. 4, S. 784, 1923.

peinlichst auf reine Pipette (rauchende Salpetersäure!) und reine Verdünnungslösung (Kontrollbestimmung!) geachtet werden muß. Weiter soll, wie immer bei solchen Arbeiten, Schaumbildung sorgfältig vermieden werden, und ist nach der Blut- oder Serumverdünnung 5 bis 10 Minuten auf Einstellung eines Gleichgewichts zu warten. Dann bringt man mit der Kapillarpipette 0,02 ccm des verdünnten Blutes auf die vorher genau geprüfte Wasseroberfläche in der Weise, daß man die 0,02 ccm in einem Tropfen ohne Luft an der Pipettenspitze ausbläst und dann die Wasseroberfläche berührt. Wenn man so vorgeht, bleiben die kapillaraktiven Moleküle des Blutes vom Anfang an in der Oberfläche konzentriert und breiten sich im Verlauf von 5 bis 10 Minuten zu einer Monomolekularschicht aus. Eine Adsorption an der Glas—Wasseroberfläche findet hierbei nicht statt.

Für normales Blut findet man bei einer Verdünnung von $^1/_{1400000}$ eine Monomolekularschicht von 80 bis 100 qcm; diese Größe scheint ziemlich konstant zu sein, mit leichter Beeinflussung durch Nahrungsaufnahme. Für das Serum ist die Oberfläche die Hälfte derjenigen des Vollblutes.

Auf die Anwendung der Methode für Blutuntersuchung, Enzymstudium und Immunreaktionen wollen wir in einer nächsten Mitteilung zurückkommen.

Zusammenfassung.

Es wurde die Unzulänglichkeit der Tropfenzahlmethode für die Untersuchung von biologischen Flüssigkeiten auf kapillaraktive Substanzen demonstriert und eine neue Methode für diese Untersuchung angegeben. Diese Methode besteht in der Ausbreitung der kapillaraktiven Substanzen in einer monomolekularen Schicht und Messung der Oberfläche dieser Schicht.

Pflanzliche Tyrosinasen.

(Mit besonderer Berücksichtigung der Chininwirkung.)

Von

F. Boas und **F. Merkenschlager.**

(Aus dem Botanischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Weihenstephan.)

(Eingegangen am 24. Dezember 1924.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

Die im folgenden beschriebenen Versuche zweigen aus einer Versuchsreihe ab, die ursprünglich Einblick in den *Rollmechanismus* des *Kartoffelblattes* gewähren sollte. Zu diesem Zwecke wurde eine große Anzahl uns geeignet erscheinender Lösungen herangezogen, in die wir die Blattstiele der Kartoffel tauchen ließen. Dabei ergab sich die Tatsache, daß Kartoffelblätter, deren Stiele in 0,1 proz. Chininsulfat

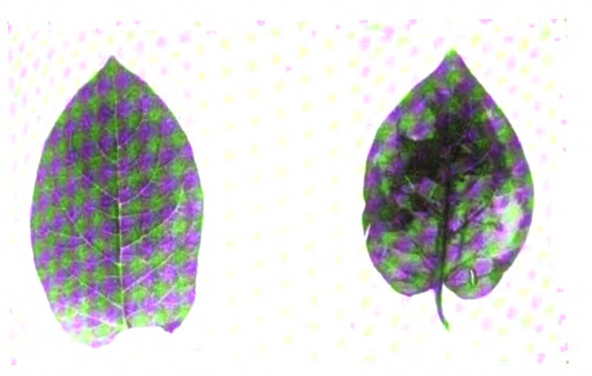


Abb. 1. Links: Kartoffelblatt, das in Wasser taucht. Rechts: Kartoffelblatt, das in Chininsulfat taucht.

tauchten, tags darauf zu beiden Seiten der Leitbündel eine deutliche, langsam mit der Verzweigung der Nervatur auch benachbarte Blatteile ergreifende Schwärzung annahmen. Diese Beobachtung schien weiterer Untersuchungen wert zu sein. Zunächst wurde durch oftmalige Wiederholungen sichergestellt, daß das Auftreten der Färbung nicht an bestimmte Voraussetzungen gebunden ist, sondern stets mit Sicherheit zu erwarten ist, wenn auch der *Zeitpunkt* des Sichtbarwerdens und die *Ausdehnung* der Färbung bei den einzelnen Versuchsobjekten *variiert.*

Ein Versuch sei aus vielen anderen herausgegriffen. Am 4. Juli 1923 mittags wurde ein Kartoffelblatt in eine 0,1 proz. Lösung von Chininsulfat gestellt, am 5. Juli, also nach 24 Stunden, mittags hob sich die Nervatur durch ihre starke Schwärzung scharf von den übrigen grünen

Blattteilen ab, am 6. Juli mittags griff die Schwärzung auf die anliegenden Gewebe über.

Es war nun festzustellen, inwieweit die Schwärzung in *Chinin eine generelle Erscheinung pflanzlicher Organe* ist oder ob sie nur auf ganz bestimmte *Pflanzen*familien und *Arten*kreise beschränkt ist.

Geprüft wurden zunächst Blätter folgender Arten: Solanum tuberosum, Beta vulgaris, Vicia faba, Sambucus nigra und Acer spec.

I. Versuche mit Blättern.

Die Ergebnisse eines vergleichenden Versuchs vom 6. Juli 1923, nachmittags 5 Uhr, mit 0,08 proz. Chininsulfat zeigt folgende Zusammenstellung.

Datum 1923	Solanum	Vicia faba	Beta vulg.	Sambucus	Acer
7.VII. 8a	Seitennerven 1. Ordnung völlig geschwärzt	Zweifelhafte Schwärzung	Zweifelhafte Schwärzung	Keine Schwärzung	Keine Schwärzung
7.VII. 10a	Seitennerven 1. Ordnung völlig geschwärzt	Das ganze Leitbündelsystem wird von der Schwärzung ergriffen	Die Gewebekomplexe *zwischen* der Nervatur verdunkeln sich zusehends	Ganz leicht, manchmal zweifelhafte Schwärzung	Keine Schwärzung
7.VII. 6p	Fortschritte der Schwärzung ins Binnengewebe	Schwärzung der Nervatur vollständig, Absterben	Fortschreiten	Schwache Reaktion, langsam fortschreitend	Negativ (vielleicht Verstopfung durch Milchsaft)
8.VII. 11a	Zusammenbruch des Blattes	Abgestorben	Absterben	Wenig Fortschritte	Negativ

Eintreten und Tiefe der Schwärzung nach diesem Versuch sind also abhängig vom systematischen Artcharakter und bis zu einem gewissen Grade vom Individualcharakter der Pflanze, wie schon hervorgehoben wurde. Im Laufe der Zeit wurde weiter eine große Anzahl von Pflanzen untersucht. Nur der folgende Versuch sei festgehalten.

Versuchsbeginn 9. Oktober 1924, mittags, mit 0,1 proz. Chininsulfat. Ergebnis am 10. Oktober 1924, morgens 10 Uhr.

Art	Pflanzenorgan	Familie	Stärke der Reaktion (Schwärzung)
Dahlia	Blatt	Compositae	+++
„	Blüte	Compositae	Blütenstiel schwarzfleckig. Kronblätter reinweiß. Die Schwärzung rückt bis an die Kelchspitzen vor
Petunia hybrida	Blatt	Solanaceae	++
Dianthus, Gartenform	„	Caryophyllaceae	—
Sinapis alba	„	Cruciferae	—
Syringa persica	„	Oleaceae	(+)
Chrysanthemum spec.	„	Compositae	+++
Solanum Lycopersicum	„	Solanaceae	+++
Lathyrus spec.	„	Papilionaceae	—
Clematis vitalba	„	Ranunculaceae	+
Pirus communis	„	Rosaceae	+++
Vicia faba	„	Papilionaceae	+++
Helianthus tuberosus	„	Compositae	+++

In dieser Übersicht bedeutet: +++ sehr stark, ++ deutlich, + schwach, doch sichtbar, — keine Schwärzung.

Abb. 2 hält das sehr instruktive Bild der Chininwirkung am Tomatenblatt fest.

Es war bemerkenswert, daß in diesem einige Pflanzenfamilien abtastenden Versuch *Cruciferen niemals* auf Chiningaben reagierten. Die *Cruciferen* haben ihren *eigenen Stoffwechsel.* Es sei nur daran erinnert, daß der Säurestoffwechsel bei dieser Familie sich in engen Grenzen hält, daß weder Oxalsäure, noch deren Salze in ihrem Stoffwechsel auftreten, abgesehen von anderen Eigentümlichkeiten des Stoffwechsels.



Abb. 2. Blatt von Solanum Lycopersicum. Links in Wasser. Rechts in Chininsulfat. Schwärzung der Nervatur und benachbarter Blatteile.

In den vorstehenden Versuchen wurden die Pflanzenorgane mit der Schnittfläche in 0,1 proz. Chininsulfatlösungen getaucht. Das *Einlegen* ganzer Blätter in eine Chininlösung in Petrischalen führte zu weniger schönen Bildern. Indessen war auch mit dieser Methode ein positiver Ausfall bei *Rosa* zu verzeichnen. Keine Reaktion zeigten bei dieser Versuchsanstellung die Blätter von Syringa, Ribes und Lolium.

In *Preßsäften* von Kartoffelblättern trat nach entsprechender Chiningabe eine Schwärzung *nicht* auf.

II. Versuche mit Samen.

Samen verschiedener systematisch weit auseinanderstehender Arten wurden halbiert und derart in eine 0,1 proz. Chininsulfatlösung

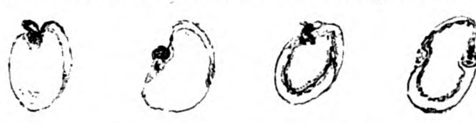


Abb. 3. Samen von Vicia faba. Linkes Paar in Wasser. Rechtes Paar in Chininsulfat.

gelegt, daß die Lösung gerade über die Samenhälften zusammenschlug. Weder Gerstensamen noch die Samen von Lupinus luteus und Lupinus angustifolius erlitten Farbveränderungen, wohl aber trat langsamer als in Blättern bei Vicia faba eine Schwärzung auf, welche nach 2 Tagen die Prokambiumstränge schön und anschaulich nachzeichnete.

III. Versuche mit Keimlingen.

6 Tage alte Keimlinge von Beta vulgaris, Hordeum, Lupinus luteus, Lupinus angustifolius und von Vicia faba tauchten in eine 0,1 proz. Chininsulfatlösung. Am nächsten Tage war das gesamte Wurzelsystem der Versuchspflanzen, mit Ausnahme von Hordeum und Lupinus, tief schwarz. Die Schwärzung hatte auch einen großen Teil des Hypokotyls ergriffen. Es sind das immer wieder die Pflanzen, die auch im normalen Verlauf ihrer Entwicklung unter bestimmten Bedingungen Schwärzungen meist als postmortale Vorgänge (ohne Chinin) zeigen.

IV. Versuche mit pflanzlichen Reservestoffbehältern.

Bereits im Herbst 1923 wurden diese Untersuchungen auf pflanzliche Reservestoffbehälter ausgedehnt, in großem Maßstabe wurden diese Versuche im Jahre 1924 fortgeführt. Dabei ergab sich eine *auffallende Differenz zwischen intakten und zerriebenen Organen. Reib*säfte von Kartoffel*knollen*, mit Chinin versetzt, dunkelten nicht früher als

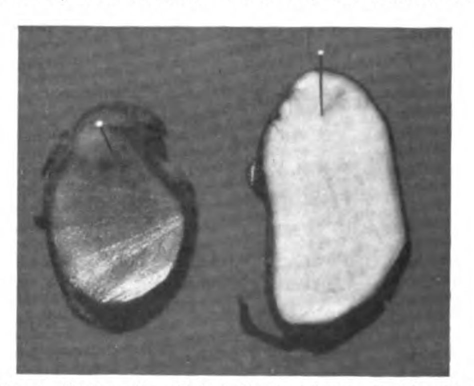


Abb. 4. Links: Kartoffelscheibe in 0,1 proz. Chininsulfat (Bild der Bakterienringfäule!) Rechts: Kartoffelscheibe in Wasser.

die Kartoffelsäfte. Kartoffelscheiben jedoch, in Petrischalen in eine 0,16 proz. Lösung von Chininsulfat eingebettet, erfahren nach wenigen Stunden bereits eine Schwärzung, welche rasche Fortschritte macht. Kartoffelscheiben in Wasser als Kontrollprobe erleiden natürlich keine Farbenveränderung. Scheiben von *Beta* bieten nach eintägigem Aufenthalt in Chinin ein charakteristisches Bild der Schwärzung. Die Gefäß-

bündel haben eine tiefschwarze Farbe angenommen. Dagegen färben sich Scheiben von *Brassica* (Dotsche, Erdrübe) durch Chinin auch nach längerer Einwirkung nicht, Brassicaarten zeigen auch sonst nie eine Schwärzung. Auch hier tritt die Sonderstellung der Kreuzblütler in Erscheinung. Indifferent wie die Cruciferen verhalten sich ferner Schnitzel der Zwiebel (Allium cepa), ebenso Stengelteile und Blatteile von Sempervivum. Schwärzung tritt dagegen wieder ein bei der Wurzel von *Dahlia* (Compositae) und *Hedychium* (Liliacea) und vor allem bei

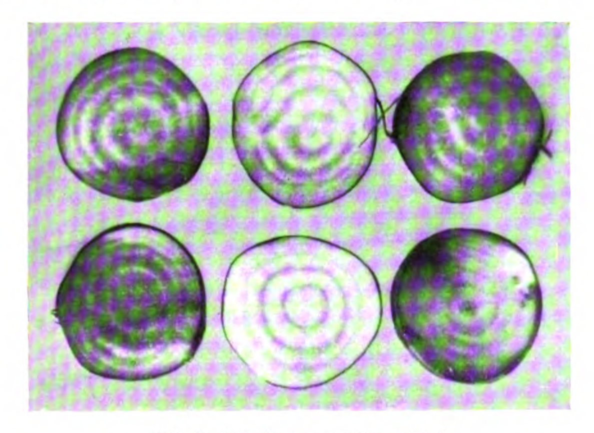


Abb. 5. Scheiben von Beta vulgaris.
Linkes und rechtes Paar in Chininsulfat. Mittleres Paar in Wasser.

Helianthus tuberosus. Bei der Chininprobe spielt, soweit unsere Untersuchungen einen Schluß gestatten, das Anion eine untergeordnete Bedeutung, deshalb werden die beschriebenen Wirkungen ebensogut von Chininsulfat, von Chininhydrochlorid wie von Chininkakodylat hervorgerufen.

Von Kartoffelschnitten und von Rübensäften war es seit längerer Zeit bekannt, daß sie an der Luft *langsam* dunkelten[1]). Kartoffeln und Rüben sind daher auch in unseren Chininversuchen diejenigen Pflanzen, welche eine Schwärzung in Chininsulfat am leichtesten annehmen. Ebenso ist *Vicia faba*, deren *postmortale Dunkelfärbung* der Stengel, Blüten und Hülsen *schon längst das Interesse* der Biochemiker wachgerufen hat, mit Sicherheit durch *Chinin* zu schwärzen.

Über die Entstehung der schwarzen Farbstoffe.

Die *Muttersubstanz* der schwarzen Farbstoffe (Melanine) ist das *Tyrosin* und seine Derivate. Die melanotischen Farbstoffe verdanken ihre Entstehung dem Zusammenwirken von zwei fermentativen Vorgängen: Durch die Wirkung eiweißspaltender Fermente werden zyklische

[1]) *Bourquelot* und *Hérissey*, Journ. pharm. chim. **14**, 21.

Komplexe aus dem Protoplasmaeiweiß abgespalten, und diese unterliegen sodann der Oxydation durch oxydative Fermente, wobei schließlich hochmolekulare Kondensationsprodukte von dunkler Färbung zustande kommen. Die enzymatische Oxydation des Tyrosins verläuft unter *Ammoniak-* und *Kohlendioxydabspaltung* und unter Aufnahme von Sauerstoff[1]).

Czapek[2]) unterstützt die zuerst von *Gonnermann*[3]) ausgesprochene Vermutung, daß zunächst *Homogentisinsäure* (*Hydrochinonessigsäure*) aus Tyrosin entstünde gemäß der Formel:

$$\underset{CH_2CHNH_2 \cdot COOH}{\overset{OH}{\bigcirc}} + 3O = \underset{CH_2 \cdot COOH}{HO\bigcirc OH} + NH_3 + CO_2$$

Stapp[4]) bezweifelt teilweise die Richtigkeit dieser Vermutung, da er Homogentisinsäure als Zwischenprodukt bei der Aufspaltung des Tyrosins durch Bakterientyrosinase chemisch nicht nachweisen konnte. Wir werden später *Versuche beschreiben, die im hohen Grade für die Wahrscheinlichkeit der Czapek-Gonnermannschen Hypothese sprechen.*

Daß wir es bei der beschriebenen Chininwirkung auf pflanzliche Organe mit einer Wirkung auf eine enzymatische Tätigkeit zu tun haben, dafür sprachen folgende Tatsachen:

1. Der *Sitz der Tyrosinase* in *Beta* ist nach *Bertrand*[5]) in den Leitbündeln. Hier ist auch nach unseren Versuchen die Chinin*wirkung am augenfälligsten*, wie aus der Abbildung zu ersehen ist.

2. Gekochte Kartoffel- und Rübenschnitzel bleiben in Chinin völlig ungefärbt. Bei der Vornahme dieses Experimentes muß einige Vorsicht walten. Bloßes Übergießen der Scheiben mit heißem Chinin genügt noch nicht, um das Enzym abzutöten, da die widerstandsfähigsten pflanzlichen Tyrosinasen ein Erhitzen auf 90° aushalten. Erst kurzes *Auf*kochen in Chinin tötet die Tyrosinase.

Unsere weiteren Versuche wurden in sehr einfacher und instruktiver *Weise in Reagenzgläsern* mit *Kartoffelstückchen* vorgenommen. Zu diesem Zwecke wurden rindenfreie prismatische Stücke von etwa 3 bis 4 cm Länge und 0,8 cm Dicke aus Kartoffeln herausgeschnitten und dann so mit den zu prüfenden Lösungen in Reagenzgläsern übergossen, daß die oberen Kanten gerade 2 bis 3 mm hoch von der Flüssigkeit überspült waren. Eintretende Schwärzung oder Dunkelfärbung der

---

[1]) *v. Hoefft*, diese Zeitschr. **104**, 1, 1920.
[2]) *Czapek*, Biochemie der Pflanzen **2**, 462–463, 1910.
[3]) *Gonnermann*, Pflügers Arch. **82**, 239, 1900.
[4]) *Stapp*, diese Zeitschr. **141**, 59, 1923.
[5]) *Bertrand*, Bull. soc. chim. **14**, 21.

Kartoffelstücke erfolgte immer von oben nach unten, denn die Melaninbildung ist ein fermentativer Oxydationsprozeß und außerdem in die Grenzen eingeengt, innerhalb deren Enzymtätigkeit überhaupt möglich ist. Außer den Kartoffelstücken färbt sich auch die Versuchsflüssigkeit mehr oder weniger intensiv zwischen hellrötlich—blauschwarz. Darauf kommen wir weiter unten zurück.

Die Abhängigkeit der Enzymwirkung von Säure und Alkali zeigt z. B. die folgende Tabelle. Daß ein Zusatz von 0,03 Proz. Alkali die Tyrosinasewirkung lebhaft fördert, haben schon *Fürth* und *Schneider*[1]) beobachtet. In unseren Versuchen tritt die Chininwirkung der Laugenwirkung gegenüber stark in den Vordergrund; vermutlich stört bei den gewöhnlichen Konzentrationen die *Verkleisterung* der Stärke und die Quellung des Plasmas die sonst beobachtete Förderung der Tyrosinasewirkung durch Alkali.

Die Wirkung von Säure und Lauge auf die Schwärzung von Kartoffelstücken zeigt der folgende Versuch vom 18. November 1923.

Nr.	Medium	Befund am 19. XI. 1923	Befund am 20. XI. 1923	Bemerkungen
1	Wasser	—	—	
2	0,1 proz. Chininsulfat .	Beginn der Schwärzung	Oberes Drittel schwarz	
3	gekocht in Chinin . . .	—	—	Entquellung
4	in Chinin + n/20 H_2SO_4 (3 ccm auf 25 ccm) . .	—	—	Starke Bleichung
5	in Chinin + n/100 H_2SO_4	—	Beginn der Schwärzung	
6	„ „ + n/200 H_2SO_4	Beginn der Schwärzung	Oberes Drittel geschwärzt	
7	„ „ 0,05 proz. NaOH	—	—	Starke Quellung
8	in Coffein halbgesättigt	—	Bräunung	
9	lufttrocknend	Schwärzung	Schwärzung	

Wenn man übrigens die geschwärzten Kartoffelstückchen untersucht, so zeigen sich die Stärkekörner geschwärzt, sie haben einen Teil der melanotischen Farbstoffe absorbiert.

V. Versuch mit Mikroorganismen.

Um zu einem vollkommenen Bild der Chininwirkung zu gelangen, wurden auch Versuche mit Mikroorganismen wie Fusarium und Hefe angestellt, aber ohne ein Resultat zu erhalten. Daß Fusariumpilze noch bei Gegenwart von 0,1 proz. Chininsulfat wachsen, sei hier nur kurz erwähnt.

Auf die mit ganz anderer Methodik durchgeführten Versuche von *C. Stapp*[2]), die auch eine kurze Darstellung der Arbeiten über Tyro-

[1]) *Fürth* und *Schneider*, Hofmeisters Beiträge 1, 229, 1901.
[2]) *C. Stapp*, diese Zeitschr. 141, 42, 1923.

sinase von *Bach, Chodat, Abderhalden, Beijerinck* bringt, sei hier nur kurz hingewiesen.

VI. Die Abhängigkeit der Färbung von der Konzentration des Chinins.

Um eine gute Schwärzung zu erzielen, darf man nicht zu geringe Konzentrationen anwenden. Die untere Grenze der zur Sichtbarmachung der Schwärzung führenden Chininkonzentration liegt überhaupt relativ hoch. Eintauchen eines Kartoffelblattes in 0,01 Proz. Chininsulfat führt z. B. keine Schwärzung herbei. Bei Kartoffel*scheiben* ist schon eine Konzentration unter 0,05 Proz. wirkungslos, dagegen gab wieder ein Vergleich der Wirkung von 0,08 Proz. und 0,16 Proz. keine wesentlichen Unterschiede. Diese Tatsache ist für die Erklärung der Chininwirkung wichtig. Es muß nach unserer Annahme offenbar eine ganz *bestimmte Zustandsänderung in der Struktur der Zelle* eintreten, damit das Enzyum *freien Lauf* erhält. Später werden wir für diese Annahme weitere Stützen finden. Von ganz besonderer Wichtigkeit ist ferner die Tatsache, daß *Preßsäfte* von Kartoffeln durch Zusatz von Chinin keine Beschleunigung des Verdunkelungsvorganges erfahren, auch an ihrer Oberfläche nicht. Mit der Annahme einer bloßen Enzymaktivierung durch Chinin kommen wir, wie diese Versuche mit Preßsäften zeigen, nicht weiter. Es muß offenbar eine bestimmte kolloidale Struktur vorliegen, damit die Reaktion vor sich gehen kann, namentlich muß eine gewisse Entquellung und auch Schädigung der intakten Zellen eingetreten sein. Zunächst wollen wir, ehe wir unsere Versuche weiter beschreiben, einen kurzen Abschnitt über die uns hier interessierenden toxikologischen und pharmakologischen Eigenschaften des Chinins einschalten.

VII. Zur Pharmakologie des Chinins.

Die zweisäurige und bitertiäre Base — Chinin — ist ein starkes Plasmagift[1]) $[C_{19}H_{26}N_2(OH)(OCH_3)]$. Charakteristisch ist sein starkes Flockungs- und Entquellungsvermögen. Auf dem Entquellungsvermögen beruht wohl die in den vorliegenden Versuchen beschriebene Reaktion. Seine spezifische Giftwirkung auf Protozoen ist bekannt. Verhältnismäßig gut studiert ist seine uns hier interessierende Wirkung auf Enzyme.

Chininchlorid und Chininsulfat wirken beschleunigend auf die Aktivität der *Amylase*. Der beschleunigende Einfluß ist dem Chinin selbst zuzuschreiben. (Die beschleunigende Wirkung des Chinins auf die Amylase wird durch den verzögernden Einfluß der Schwefelsäure und des Harnstoffs eingeschränkt.)

Chininchlorid aktiviert am besten bei einer Konzentration von 0,009 bis 0,014 Proz., Sulfat bei 0,03 Proz.[2]).

---

[1]) *Hosters*, Naturwissensch. **2**, 554, 1914.
[2]) *J. A. Smorodinzew* und *A. S. Nowikow*, diese Zeitschr. **140**, 12, 1923.

Nierenextrakt*lipase* ist gegen Chinin völlig unempfindlich[1]). Eine der physiologischen und pharmakologischen Wirkungen des Chinins auf den Organismus der höheren Tiere ist angeblich die Verzögerung des Stickstoffzerfalls. Chininsulfat verzögert die Wirkung des Trypsins auf das Casein. Der verzögernde Einfluß des Chininsulfats tritt schon bei einem Gehalt von 0,009 Proz. davon im Medium zutage. In salzsaurem und schwefelsaurem Chinin wird der verzögernde Einfluß auf das Trypsin durch das Chinin selbst bedingt, da er nicht vom Anion abhängt[2]).

Chinin und Coffein sind sowohl auf Maltase als auch auf d-Methylglucosidase unwirksam. Auf die Arbeiten von *Rona*[3]) und Mitarbeitern sei hier nur kurz hingewiesen.

Die Herabsetzung der Oxydationstätigkeit im Organismus durch Chinin ist längst bekannt. Die hemmende Wirkung des Chinins auf die Atmung muß auf die Alkaloidbase zurückgeführt werden; der hemmenden Wirkung des Chinins auf die Atmung geht eine fördernde voraus.

Parallelen zur menschlichen Pathologie.

Eine Dosierung von Chinin, die nicht auf die Individualität des Patienten abgestimmt ist, ruft bei Malariakranken nicht selten die unter dem Namen „*Schwarzwasserfieber*"[4]) bekannte gefährliche Krankheit hervor. Wie der Name sagt, handelt es sich um das Auftreten schwarzer Produkte, deren Entstehungsweise noch heute ungeklärt ist. Ein Teil der Forscher spricht von Melaninen, ein anderer von Hämatinen. Ob das Auftreten von Schwarzwasserfieber an eine Chinintherapie gebunden ist — die überzeugten Verfechter der Chinintherapie bestreiten es —, steht hier nicht zur Diskussion. Was unsere Versuche betrifft, so wird die Medizin zu entscheiden haben, ob sie in Beziehung zum Schwarzwasserfieber gebracht werden können. Uns erscheint die Ähnlichkeit der Vorgänge so überraschend, daß wir den Hinweis auf das Schwarzwasserfieber unbedingt für geboten halten. Die bisherigen Erklärungsversuche sind unsicher. Die am meisten besprochenen seien hier entwickelt:

M. Nierenstein[5]) nimmt an, daß zwischen Chinin, Hämochinonsäure und Schwarzfieber Beziehungen bestünden.

St. Rusznyak[6]) konnte eine Steigerung der Chininwirkung durch fluoreszierende Stoffe (wie Eosin) erreichen. Es spricht von einer photodynamischen Wirkung des Chinins und denkt an eine Zersetzung des Hämoglobins. Wir möchten hier bemerken, daß in unseren Versuchen eine merkliche Steigerung der Chininwirkung durch Zusatz von Eosin nicht beobachtet werden konnte. Die Schwärzung von Kartoffelscheiben in Chininsulfat tritt auch auf, wenn das Objekt sich während der ganzen Versuchsdauer im Dunkeln befindet. In einer weiteren Arbeit schreibt Rusznyak[7]):

[1]) *Rona* und *Haas*, diese Zeitschr. **141**, 235, 1923.

[2]) *J. A. Smorodinzew* und *A. N. Adowa*, ebendaselbst **135**, 119, 1923.

[3]) *Rona, Bloch* und *Lasnitzki*, diese Zeitschr. **128**, 169; **130**, 582, 1922.

[4]) *Ziemann*, Malaria, Menses. Handbuch der Tropenkrankheiten. 2. Aufl., 1917. In einer brieflichen Notiz spricht sich *Ziemann* für einen *fermentativen Vorgang* bei dem Auftreten der Melanine der Schwarzwasserfiebererkrankung aus.

[5]) *Nierenstein*, Brit. Med. Journ. 1920.

[6]) *Stephan Rusznyak*, Wien. klin. Wochenschr. **33**, 3—8.

[7]) *Derselbe*, diese Zeitschr. **104**, 13, 1920.

„Eine pathologische Wichtigkeit gebührt am ehesten vielleicht der bedeutenden Förderung der CO_2-Hämolyse durch das Chinin. Diese Wirkung des Chinins könnte bei der Entstehung des Schwarzwasserfiebers eine Rolle spielen. Es wäre denkbar, daß bei einer lokalen Zirkulationsstörung in den inneren Organen bei Gegenwart einer genügenden Chininkonzentration durch die vermehrte Kohlensäure eine Hämolyse ausgelöst wird."

Unser Interesse war natürlich darauf gerichtet, Parallelen zur Schwarzwasserfieberfrage zu bekommen, und so möchten wir gleich hier darauf hinweisen, daß es uns mit *primärem Phosphat* und mit Tonophosphan gelang, die Chininwirkung zu retardieren, während *I. Matko* bei Malariakranken mit *Dinatriumphosphat* das Schwarzfieber erfolgreich bekämpft. Im übrigen vergleiche man das Kapitel über Retardierung der Chininwirkung.

Nach dieser kurzen Abschweifung wenden wir uns der Darstellung unserer Chininversuche im einzelnen zu.

Für die *Erklärung* der Chininwirkung ist dabei die Tatsache von Wichtigkeit, daß die Melaninbildung sich durch *verschiedene Eingriffe* in den *Zellmechanismus* erzwingen läßt. Die Chininwirkung läßt sich z. B. durch *kurzes Erwärmen* der Kartoffelstücke ersetzen. Es handelt sich also offenbar bei unseren Versuchen *weniger* um eine Aktivierung der Tyrosinase als um eine Störung des Zellgleichgewichts. Die weniger empfindliche Tyrosinase bekommt dadurch einen Vorsprung. Alle weiteren Versuche deuten in diese Richtung. In den normalen Zellen herrscht gewöhnlich ein äußerst labiles, aber ebenso sorgfältig abgeglichenes Gleichgewicht, so daß die Tyrosinasewirkung normalerweise nicht zur Geltung kommt. Durch Beseitigung der Hemmungsstoffe läßt sich daher unter Umständen die Tyrosinasewirkung in geradezu großartiger Weise zur Geltung bringen. Am besten gelingt dies, wie gesagt, durch Erhitzen auf 60 bis 80° C. Es ist dann einmal die Zellstruktur gestört, dann aber sind die Antistoffe, soweit sie thermolabil sind, beseitigt, und da die Tyrosinase hohe Temperaturen aushält, so bekommt man, da sie nun sozusagen Freilauf hat, eine glänzende Tyrosinasewirkung.

Zu diesem Zweck werden Kartoffelprismen in heißes Wasser von 75 bis 80° C in Bechergläser geworfen. Das Wasser soll wie in den anderen Versuchen gerade über die Objekte zusammenschlagen. Das Enzym wird, wie schon früher hervorgehoben wurde, durch diese Hitzegrade nicht zerstört (erst bei 90°), wohl aber die Struktur der Zellen. Die Kartoffelschnitzel haben tags darauf eine Schwärzung angenommen, die *selbst die Chininwirkung* übertrifft.

Unsere Vorstellung vom Freilauf der Enzyme findet ein weiteres Analogon in einem Verfahren, das die Brauindustrie schon seit längerer

Zeit in Anwendung hat, dem Kohlensäurerastverfahren[1]). Die keimenden Gerstenkörner werden ihrer eigenen Atmungskohlensäure ausgesetzt und erleiden hierin eine Atmungshemmung, während die Diastasefunktion weiterläuft. [Zweck: Herabsetzung des Substanzverlustes, durch Atmung (Trockenschwund)].

Wir suchten unsere obige Vorstellung zunächst weiter durch einen Versuch mit Toluol auf die Probe zu stellen, dessen enzymschonende und zellfunktionslähmende Eigenschaft bekannt ist. Der Erfolg war überraschend.

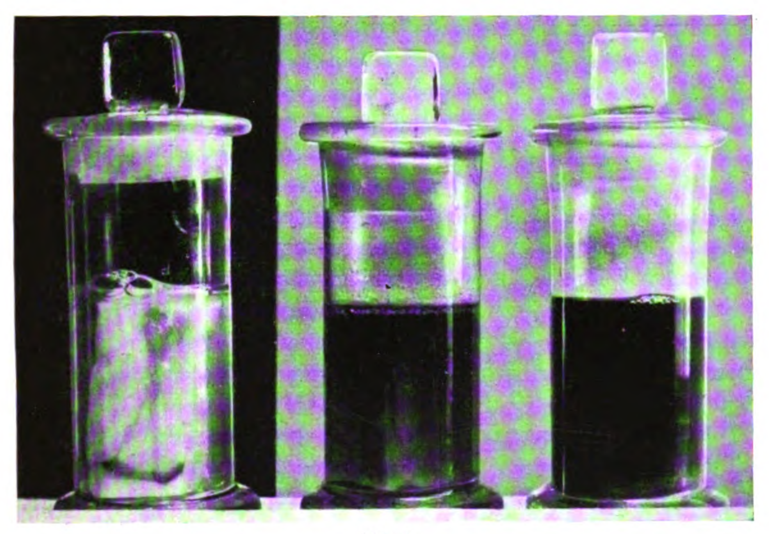


Abb. 6.
Kartoffelstücke links in Wasser, in der Mitte in Toluolwasser, rechts in Chininsulfat (0,1 proz.).

Es tritt eine starke Braunschwarzfärbung der Gewebestücke ein. Für die Erklärung dieser auffallenden Toluolwirkung kommen folgende zwei Gesichtspunkte in Betracht. Toluol ist nach *Haehn*[2]) ein sehr guter Luftüberträger.

Toluol bewirkt aber nach unserer Auffassung eine erhebliche Änderung des kolloidalen Zustandes der Zelle. Die mit Toluol erzielte Bräunung bleibt an Tiefe hinter der Chininwirkung zurück (die sehr starke Toluolwirkung auf Vicia faba siehe weiter unten), ist aber doch sehr intensiv, wie Abb. **6** zeigt.

Statt Toluol läßt sich übrigens auch Äthyl- und Methylalkohol verwenden, wie der folgende Versuch vom 28. Oktober 1924 mit Kartoffelstücken zeigt.

---

[1]) *H. Leberle*, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 1922, S. 96; 1923, Nr. 19.
[2]) *Haehn*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **52**, 2040, 1919.

*

Versuch mit Kartoffelstücken vom 28. Oktober 1924.

Medium	Ergebnis am 29. X. 1924
1 proz. Alkohol	keine Veränderung
3 „ „	keine Veränderung
9 „ „	tiefschwarz
Methylalkohol 1:8 . . .	etwas tiefer schwarz als 9 proz. Äthylalkohol
0,1 proz. Chininsulfat . .	tiefschwarz

Schon aus diesen Versuchen geht hervor, daß sich die Chininwirkung durch verschiedene andere Verbindungen ersetzen läßt. Die Chininwirkung ist also nichts für Chinin Spezifisches. Die relativ vielen Stoffe, welche dieselbe Wirkung wie Chinin ausüben, lassen sich in drei Gruppen einteilen:

1. Chinin;
2. Salze;
3. die eigentlichen Ausgangsprodukte und Zwischenstufen der Melaninbildung. Hierher gehört zuerst Tyrosin, die Ausgangssubstanz für die Tyrosinasewirkung, ferner Hydrochinon, Brenzcatechin (das dritte Dioxybenzol Resorcin ist wirkungslos) und schließlich Phenol.

Bei den Chininsalzen sowie bei den Salzen treten je nach der Kolloidwirkung der Salze recht verschiedene Farbtönungen auf[1]). Namentlich mit Phenol erhält man ein schönes Rot (Prämelaninbildung *Haehns*).

Durch Zugabe von Tyrosin, Hydrochinon und Brenzcatechin erhält man meist momentane Bildung von Farbtönungen, für schnelle Versuche ist diese Methodik sehr bequem.

Die anderen Verbindungen (Chinin, Salze usw.) wirken über den Weg einer Störung der Zellstruktur, durch Änderung des Dispersitätsgrades der Zellkolloide, durch Hemmung von Antistoffen, die empfindlicher gegen Eingriffe sind als der relativ widerstandsfähige Tyrosinasekomplex, so daß letzterer geradezu „Freilauf" erhält.

Was im *Reagenzglas* durch *chemische Eingriffe* erzielt, tritt in der Natur im *Organismus* als *Alters-*, *Absterbe-* oder *Krankheitserscheinung* auf. Die Störung bzw. Änderung der Struktur bedingt dann ein Hervortreten sonst im Gleichgewicht der Zellfunktionen zurückgehaltener Vorgänge. So färbt sich Vicia faba im *Alter* schwarz, kranke Pflanzen, wie Beta (Rüben) oder Kartoffeln, verhalten sich ähnlich. Darauf sei hier nur kurz hingewiesen.

Unsere Methodik weicht nach diesen kurzen Darlegungen insofern erheblich von der üblichen Methodik derartiger Versuche ab, als wir an *ganzen Gewebsstücken* ohne Zusatz von Tyrosin die Tyrosinase-

[1]) *Haehn*, diese Zeitschr. **105**, 170, 1920.

wirkung studierten. Dabei bekamen wir die von *Haehn* unter ganz anderen Bedingungen gefundene *Salzstimulierung* teilweise sehr deutlich bei Alkalien, dagegen trat die von *Haehn*[1]) beobachtete Aktivierung mit Calciumchlorid nicht ein Daß aber unsere Versuche nicht mit denen anderer Autoren vergleichbar sind, da wir mit intakten Gewebestücken arbeiteten, muß nochmals betont werden.

Unsere ganz andere Methodik bedingte die zahlreichen Versuche, von denen wir im folgenden einen Ausschnitt bringen. Diese Methodik geht nicht darauf hinaus, den *isolierten* Enzymkomplex Tyrosinase zu aktivieren, sondern die Zellstruktur zu beeinflussen und die Struktur der Zelle teils zu stützen, teils zu lockern; dadurch unterscheiden sich unsere Versuche grundsätzlich von den Arbeiten über Tyrosinase.

Die Störung der Zellstruktur bzw. Herbeiführung bestimmter kolloidaler Zustände in der Zelle suchten wir durch Verwendung relativ hoher Salzkonzentrationen zu erreichen (n/2, n). Daß mit niedrigen Konzentrationen schwache Färbungen erzielt wurden, wenn die Einwirkung zeitlich lange genug währt, liegt ganz im Sinne unserer Gedankengänge. Unsere außerordentlich einfache Methodik ist für Vorlesungsversuche sehr bequem, obendrein läßt sie, wie hier nicht veröffentlichte Versuche zeigen, die zurzeit im hiesigen Laboratorium laufen, die Erscheinungen des Dispersitätsgrades, auf die bei Tyrosinasewirkungen *Haehn* hingewiesen hat, sehr schön demonstrieren.

Die folgenden Versuche wurden durchaus in Reagenzgläsern an Kartoffelprismen durchgeführt. Wir bringen zuerst einen Versuch mit 0,1 proz. Chininsulfat als Vergleichsprobe und mit Kartoffeln in *Normallösungen.* Die Ergebnisse zeigt die folgende Zusammenstellung:

Kartoffelstücke in 0,1proz. Chininsulfat. Versuchsbeginn 26. Oktober 1924.
Kartoffelstücke in Reagenzgläsern.

Nr.	Normallösungen von	Beobachtung am	
		27. X. 1924	28. X. 1924
1	KCl	deutlich geschwärzt	Färbung läßt nach
2	KSCN	weiß geblieben	weiß
3	K_2SO_4	deutlich geschwärzt	entfärbt
4	BrK	sehr tief schwarz	fortschreitend
5	prim. Natriumphosphat	rein weiß geblieben	weiß
6	NaBr	sehr tief schwarz	fortschreitend
7	$NaNO_3$	genau so wie bei KNO_3	„
8	Na_2SO_4	deutlich geschwärzt	entfärbt
9	NaSCN	rein weiß	rein weiß
10	Ca-Rhodanid	„ „	„ „
11	Ba-Rhodanid	„ „	„ „
12	NH_4NO_3	wie KNO_3 und $NaNO_3$	fortschreitend

[1]) *Haehn*, diese Zeitschr. 105, 178, 1920.

Der Versuch zeigt, daß mit den Neutralsalzen der Alkalien mit Ausnahme der Rhodanide starke Schwärzung bei Kartoffeln hervorzurufen ist. Bemerkenswert ist das *Verschwinden* der Färbung in Sulfaten am zweiten Tag.

Derselbe Versuch mit n/2 Lösungen (Beginn 27. Oktober 1924) ergab folgendes Resultat:

Nr.	n/2 Konzentration	Ergebnis am 28. X. 1924	Ergebnis am 29. X. 1924
1	KCl	weiß	alles entfärbt bzw. weiß geblieben
2	KNO_3	Hauch von Schwärzung	
3	KSCN	weiß	
4	K_2SO_4	deutlich schwarz	
5	BrK	weiß	
6	NaH_2PO_4		
7	NaBr		
8	Na_2SO_4	ganz leicht geschwärzt	
9	NaSCN	weiß	
10	Ca-Rhodanid		
11	Ba-Rhodanid		
12	NH_4NO_3	Hauch von Schwärzung	

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Verwendung halbnormaler Lösungen bereits zur Verminderung bzw. zum Ausfall der Schwärzung führte. Doch ist bei anderen Versuchen festgestellt worden, daß nach 3 bis 4 Tagen noch mit n/8 Salzlösungen (der Alkalisulfate) ein positives Ergebnis erzielt wird. Doch sind für schnellere und stärkere Färbungen die höheren Konzentrationen von n/2 aufwärts vorzuziehen, ja geradezu unerläßlich.

Wenn in den folgenden Versuchen die verschiedensten Salze und Verbindungen anorganischer und organischer Natur nebeneinander

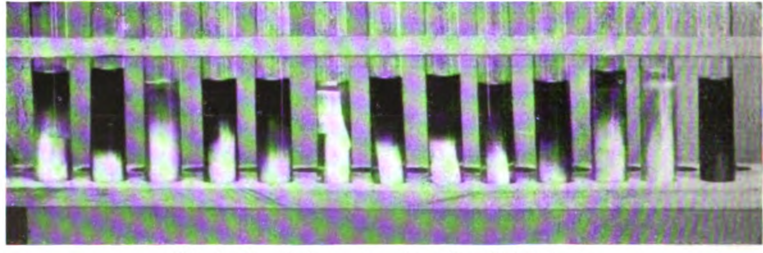


Abb. 7. Von links nach rechts: Kartoffelstücke in:
0,1 proz. Chininsulfat,
n KNO_3,
n K_2SO_4 (bereits entfärbt),
n $NaNO_3$,
n NH_4NO_3,
n KSCN,
n Li_2SO_4,
n $LiNO_3$,
n BrK,
n BrNa,
n/2 KNO_3 + n/2 $NaNO_3$,
n/2 K_2SO_4 + n/2 KNO_3 (Hemmung der Melaninbildung),
0,25 proz. Hydrochinon.

stehen, so ist das aus der Natur unserer zahlreichen Tastversuche methodisch begründet, wir suchten uns von einer physiologisch wirk-

samen Substanzvergleichsweise an eine andere durch irgendwelche Beziehungen verwandte heranzufinden, um so allmählich einen Überblick und einen Einblick in den Mechanismus des ganzen Vorganges zu erhalten.

Den Grad der Färbungen bei unserer Methodik zeigt die Abb. 7.

An die Versuche mit Alkalien schließen wir einen Versuch mit stark kolloidaktiven Verbindungen wie Aluminium- und Mangansulfat, $CaCl_2$ und mit einigen Narkoticis an.

Der Versuch vom 29. Oktober, 10 Uhr, ergab folgendes Resultat.

Nr.	Medium	Ergebnis am 30. X. 1924
1	Wasser (Kontrolle)	negativ
2	Chinin (0,1 proz.) . . } Reaktion setzt bereits nachmittags ein	fortschreitend
3	Chinin + 1 Tropfen Formalin auf 25 ccm } Reaktion setzt bereits nachmittags ein	gehemmt
4	Chinin + n/20 Mangansulfat (3 ccm auf 20 ccm)	} weiß
5	m/100 $Al_2(SO_4)_3$ } ohne Chinin	} weiß
6	m/40 $Al_2(SO_4)_3$ } ohne Chinin	} weiß
7	2 Proz. $CaCl_2$	Hauch einer Schwärzung
8	m/2 Na_2SO_3	} alles weiß geblieben
9	Dimethylharnstoff ass.	} alles weiß geblieben
10	„ sym. (2 proz.)	} alles weiß geblieben
11	Äthylharnstoff	} alles weiß geblieben
12	n/8 Urethan	} alles weiß geblieben
13	Toluol 1 Tropfen } setzt bereits nachmittags ein	} fortschreitend
14	Xylol 1 „ } setzt bereits nachmittags ein	} fortschreitend
15	Äther 1 „ (kaum sichtbar)	Hauch

Xylol erreicht übrigens in seiner Wirkung Toluol nicht, ist aber von unzweifelhafter Wirkung, während Äther ohne Einfluß ist. Der paralysierende Eingriff des Mangansulfats trat auch in diesem Versuch in Erscheinung.

Da in verschiedenen Versuchen ein deutlicher Unterschied in der Wirkung der Nitrate und Sulfate auftrat, lag die Untersuchung einer gegenseitigen Beeinflussung nahe. Der folgende Versuch vom 1. November 1924 zeigt denn auch einen deutlichen Antagonismus zwischen dem NO_3- und SO_4-Ion.

Nr.	Medium	Ergebnis am 2. XI. 1924
1	n/2 $NaNO_3$ + n/2 KNO_3 . .	} deutlich geschwärzt
2	n/2 $NaNO_3$ + n/2 KNO_3 . .	} deutlich geschwärzt
3	n/2 $NaNO_3$ + n/2 KNO_3 . .	} deutlich geschwärzt
4	n/2 KNO_3 + n/2 K_2SO_4 . .	fast weiß

Sulfate und Nitrate, gleichzeitig gegeben, heben sich also auf (Ionenantagonismus). Hingegen stören die Kationen, wenigstens die einwertigen einander nicht. Die Färbung ist allerdings — wie bemerkt

werden muß — nicht so tief, als wenn *ein* Salz allein zur Wirkung gelangt.

Die Prüfung der Wirkung weiterer Verbindungen auf Kartoffelstücke, ebenso das Verhalten von Reibsaft gegen Chininsulfate zeigt der folgende Versuch vom 1. November 1924.

Nr.	Medium: Normallösungen (wo nichts anderes bemerkt)	Ergebnis am 2. XI. 1924	Ergebnis am 4. XI. 1924
	a) Normallösungen von Neutralsalzen.		
1	$MgSO_4$	negativ	negativ
2	$CaCl_2$	negativ	negativ
3	Lithiumsulfat	schwach positiv	tiefschwarz
4	KNO_3	tiefschwarz	tiefschwarz
5	NH_4NO_3	stark schwarz	„
6	K_2SO_4	schwach	Färbung verschwunden
	b) Sonstige Verbindungen.		
7	Wasserstoffsuperoxyd (1 ccm einer 3 proz. Lösung) . . .	negativ	negativ
8	Chininsulfat	stark positiv	stark positiv
9	„ + Wasserstoffsuperoxyd	stark positiv	stark positiv
10	Lithiumnitrat	positiv	tiefstschwarz
11	Sublimatwasser 1:1000 . . .	„	schwarz
12	10 proz. Rohrzucker	negativ	negativ
13	Glykocholsaures Natrium . .	„	„
14	Taurocholsaures „ . .	„	„
	c) Reibsaftversuch.		
15	Kartoffelstücke in *Kartoffelreibsaft*, der mit 0,1 proz. Chininsulfat hergestellt wurde . .	schwach	negativ
	d) Adsorptionsversuch.		
16	Kartoffelstücke in Chinin, das durch Kaolin filtriert wurde	negativ	negativ
17	Kartoffelstücke in Chinin, das durch Tierkohle filtriert wurde	negativ	negativ

Aus den Ergebnissen des folgenden Versuchs vom 1. November 1924 sei hervorgehoben:

Die Normallösungen der *Erdalkalien* brachten bei Verwendung von Kartoffelstücken keine *Schwärzung* hervor.

Dagegen erhielt *Haehn* gerade mit $CaCl_2$ bei Verwendung von *Tyrosinaselösungen* gute Wirkung.

Zwischen dem Sulfat und dem Nitrat des Lithiums bestanden keine Unterschiede. Während beim *Kaliumsulfat*, wie erwartet, die Schwärzung am zweiten Tage zurückging, blieb sie in *Lithiumsulfat* bestehen. Daß das Chininsulfat durch Kaolin und Tierkohle stark absorbiert wird, war schon längst bekannt, und so bieten die Nr. 16 und 17 dieses Versuches nichts Überraschendes.

Daß Lösungen von Erdalkalisalzen im Gegensatz zu denen der Alkalien wenig wirken, wurde mehrfach beobachtet, namentlich wenn sie in Normallösungen angewendet werden. Aber auch die Verwendung geringerer Konzentrationen scheint wirkungslos zu sein, wie der folgende Versuch zeigt:

Versuch mit Kartoffelprismen mit Erdalkalisalzen vom 3. November 1924.

Nr.	Medium	Ergebnis am 4. XI. 1924
1	n $CaCl_2$	Hauch einer Färbung
2	n/2 $CaCl_2$	negativ
3	n/4 $CaCl_2$	
4	n/8 $CaCl_2$	
5	n/20 $CaCl_2$	
6	n $Ca(NO_3)_2$	Hauch
7	n/2 $Ca(NO_3)_2$	negativ
8	n/4 $Ca(NO_3)_2$	
9	n/8 $Ca(NO_3)_2$	
10	n/20 $Ca(NO_3)_2$	
11	n KNO_3	stark positiv
12	n $MgSO_4$	negativ
13	n/2 $MgSO_4$	
14	n/4 $MgSO_4$	
15	n/8 $MgSO_4$	
16	n/20 $MgSO_4$	
17	n K_2SO_4	positiv

Es unterscheiden sich also bei unseren Versuchen Alkalisalze und Erdalkalisalze erheblich voneinander.

In den im vorstehenden beschriebenen Versuchen wurde auf die Art und Tiefe der auftretenden Farbtönungen keine Rücksicht genommen. Es ist nunmehr nötig, kurz auf die *Tatsache*, daß sehr *verschiedene Färbungen auftreten*, hinzuweisen und die *kolloid-chemische Ursache* dieser verschiedenen Färbungen, die auf wechselnden *Dispersitätsgraden* beruhen, zu betonen.

In Chininsulfatlösungen treten *tiefbraunschwarze* Töne, in Lösungen von *Nitraten* z. B. mehr *heller rötlichbraune* Färbungen auf. Wie *H. Haehn* nachgewiesen hat, liegen in diesen *verschiedenen Tönungen dieselben chemischen Individuen*, aber in wechselndem *Dispersitätsgrad* vor. *Haehn* schreibt von seinen Versuchen mit *Lösungen* von Tyrosinase:

„Betrachtet man die violettrote Melaninlösung im auffallenden Licht, so erscheint sie stark schwärzlichbraun, während die Beobachtungen bei durchfallenden Strahlen eine weniger intensive und mehr nach Violettrot neigende Färbung erkennen läßt (Bichroismus).

Diese für die Kolloidnatur allgemein charakteristische, selektive Lichtadsorptionserscheinung macht sich auch als Trübungsstärke bemerkbar, die von Rot nach Violettschwarz, Blau und Blauschwarz zunimmt. Ein weiteres untrügliches Zeichen für den dispersen Charakter ist die Koagulierbarkeit des roten Pigmentes zum grünlichschwärzlichen beim Aufkochen. Der Umschlag erfolgt momentan. Rotes Melanin läßt sich bei geeigneter Porengröße der Filter unschwer ultrafiltrieren. Mithin handelt es sich nicht um eine molekulare Lösung, sondern um eine feine Teilchensuspension.

Die stufenweise Bildung der verschiedenen Pigmente ist als ein langsamer Koagulationsvorgang zu betrachten, indem sich aus den kleinen rotgefärbten Stoffteilchen durch Kondensation größere bilden, wodurch das neue Pigment entsteht. Das rote Melanin wäre also die feine disperse, die anderen Pigmente die grob dispersen Phasen."

Die Anschauungen von *Haehn*, die an *Tyrosinaselösungen* gewonnen sind, sind zweifellos richtig. Auch bei unseren Versuchen mit *Kartoffelprismen* konnte durch *Aufkochen dunklere Färbung* erzielt werden. Außerdem erhält man je nach den verwendeten Salzlösungen, verschiedene Farbtönungen, d. h. Dispersitätsstufen, wie der folgende Versuch mit Kartoffeln vom 6. November 1924 zeigt.

Nr.	Kartoffelprismen in	Tönungen am 7. XI. 1924	Tönungen am 8. XI. 1924
1	Chinin (0,1 proz.) .	dunkel	fortschreitend
	Normallösungen von:		
2	KNO_3	mehr ins Braune gehend	
3	K_2SO_4	zwischen den beiden vorigen liegend	entfärbt
4	$NaNO_3$	etwas dunkler als KNO_3	
5	NH_4NO_3	wie KNO_3	
6	KSCN	schneeweiß	
7	Lithiumsulfat . . .	beide gleich im Farbton und an die Chininwirkung antönend	
8	Lithiumnitrat . . .		
9	BrK	beide gleich tief dunkel	
10	BrNa		

Im allgemeinen sind die durch Nitrate erzeugten Tönungen heller als die mit Sulfaten. Bei geeigneter Versuchsanordnung bekommt man eine völlige Skala der Färbungen, die völlig dem Dispersitätsgrad der Melanine entspricht. Die Skala läuft von Hellrot über Braun, Braunschwarz zu Schwarz und Blauschwarz.

Nach der Prüfung der kolloidchemisch interessierenden Salze der Alkalien und Erdalkalien und einiger anderer Verbindungen müssen kurz die Ergebnisse der Versuche mit einigen organischen Verbindungen erwähnt werden.

Wir untersuchten mit unserer Methodik die Wirkung der drei zusammengehörigen Dioxybenzole: Hydrochinon, Brenzcatechin und Resorcin. Die Verwendung von Tyrosin als der Muttersubstanz der Tyrosinasewirkung braucht nicht weiter hervorgehoben zu werden. Die Verwendung von Phenol lag bei der Einbeziehung der Phenolase[1]) in den Tyrosinasekomplex ohne weiteres nahe. Weitere Verbindungen wurden nicht geprüft, man vergleiche hierüber *Wohlgemuths* Fermentmethoden.

Unsere Versuche lassen sich dahin zusammenfassen:

Erste Gruppe: 1. Hydrochinon (0,1 bis 0,25 proz.) *veranlaßt momentane Melaninbildung.* Ebenso explosiv wirkt:

2. Brenzcatechin, dagegen ist

3. Resorcin, das dritte Dioxybenzol, *wirkungslos.*

Zweite Gruppe: Tyrosin verhält sich ähnlich wie Hydrochinon.

Dritte Gruppe: Phenol wirkt träger, führt aber in 12 Stunden zu prachtvoller Rötung (Prämelanine *Haehns*).

Nach dieser kurzen Zusammenfassung bringen wir einen Versuch mit *Hydrochinon,* an das sich die Prüfung anderer organischer Verbindungen anschließt.

Versuchsbeginn 9. November, 5 Uhr nachmittags.
Konzentration der Lösungen, soweit nichts anderes angegeben, 0,1 Proz.

Nr.	Medium	Ergebnis am 4. XI. 1924, 5h
1	Chinin (0,1 proz.)	positiv, wie üblich
2	Cocain — Chlorhydrat 0,1 proz.	negativ
3	Hydrochinon 0,1 proz.	*Die Reaktion beginnt nach wenigen Augenblicken*
4	Sublimoform	schwach positiv
8	Papayin (Reuss.)	negativ
9	Chinin + Spur Hydrochinon	stark positiv
10	Ninhydrin 0,5 proz.	tiefblau, Aminosäuren
11	Succinamid 0,1 proz.	wirkungslos
12	Phlorrhizin	oberes Drittel stark *gelb*
13	m/3 Thioharnstoff	negativ
14	Betain hydrochlor	negativ
15	Chloralhydrat	negativ
16	Salicylamid 0,1 proz.	negativ
17	Hydroxylamin	negativ
18	Methylenblau	oben tiefblau, unten weiß. Die üblichen Bilder der Reduktasenwirkung

Das wichtigste Ergebnis dieses Versuches ist die dem *Chinin ähnliche.*

[1]) *Haehn,* diese Zeitschr. **105**, 191, 1920.

Hydrochinonwirkung.

Sie wird wenige Augenblicke nach der Zugabe von Hydrochinon sichtbar. Zunächst durch *Rötung*, die Schritt für Schritt im Laufe des Tages in eine Braunschwärzung übergeht. Dadurch ist die schon oben erwähnte Anschauung von *Czapek-Gonnermann*, daß Hydrochinon-Essigsäure (Homogentisinsäure) das Zwischenprodukt darstelle, wohl sehr wahrscheinlich gemacht.

Die Tiefe der Hydrochinonwirkung ist von der Konzentration weitgehend abhängig, wie folgender Versuch zeigt.

Ermittlung der optimalen Konzentration des Hydrochinons.

Nr.	Medium	Stärke der Färbung
1	0,25 proz. Hydrochinon . . .	Die Reaktion nimmt mit fallender Konzentration ab
2	0,12 „ „ . . .	
3	0,06 „ „ . . .	
4	0,03 „ „ . . .	

Hydrochinon stellt eben ein Zwischenprodukt bei der Melaninbildung dar, daß es wie ein Zünder wirkt, ist daher verständlich.

Langsamer wirkt *Phenol*. Doch ist auch hier innerhalb 12 Stunden ein herrliches *Rot* zu erzeugen.

Wenn Tyrosin die Melanin- und Farbstoffbildung intensiv fördert, so braucht das nicht besonders hervorgehoben zu werden, da Tyrosin die Grundsubstanz der Tyrosinasewirkung ist. In den folgenden Versuchen dient daher die Tyrosinprobe als bequeme Vergleichsprobe zur Wirkung anderer Stoffe.

Wie Hydrochinon wirkt Brenzcatechin. Dies zeigt die folgende Zusammenstellung, in der auch Vergleichsversuche mit der Muttersubstanz der Melanine Tyrosin, ferner mit Aminosäuren und Phenol angeführt sind.

Nr.	Medium	Grad der Färbung nach etwa 4 Std.	
1	0,2 proz. Brenzcatechin	+++	Die Reaktion beginnt momentan
2	0,25 „ Hydrochinon	+++	
3	0,2 „ Brenzcatechin	+++	
4	0,25 „ Hydrochinon	+++	
5	0,2 „ Brenzcatechin	+++	
6	0,25 „ Hydrochinon	+++	
7	0,2 „ Brenzcatechin	+++	
8	0,25 „ Hydrochinon	+++	
9, 10	Kartoffelstücke gekocht, dann in 0,2 proz. Brenzcatechin	±	
11, 12	0,1 proz. Brenzcatechin	+++	

Medium	Färbung der Proben
0,1 proz. Tyrosin . . . . . . 0,1 „ Hydrochinon	Die Reaktion beginnt nach kurzen Augenblicken als Rötung und führt nach einem Tag zu tiefer Schwärzung
0,1 „ Leuzin	am nächsten Tag spurenweise Schwärzung
0,1 „ Asparagin . . . . . 0,1 „ Resorcin	wirkungslos
Phenol, Rötung am Tag darauf	*Die Färbung geht beim Aufkochen in Schwarz über.* (Dispersitätsgradsänderung)

In diesem Zusammenhang sei auch auf einen früher schon erwähnten Versuch mit *Coffein* kurz hingewiesen. Coffein bewirkt eine ganz eigenartige Braunfärbung. Dieser positive Versuch mit Coffein scheint deshalb von größerem Interesse zu sein, weil *O. Loew*[1]) bei Spirogyra und vielen anderen Pflanzen Ausfällungen von Eiweiß — also wohl eine Änderung bzw. Störung der Zellstruktur — erzielt hat. Bei der Kartoffelknolle scheint Coffein im Prinzip ganz ähnlich zu wirken. Durch Störung und Hemmung empfindlicher Vorgänge treten weniger empfindliche in den Vordergrund. Die *Coffein*wirkung äußert sich also offenbar in sehr *verschiedener* Weise, darauf wurde kaum noch geachtet.

In den vorliegenden Versuchen sind, ausgehend von der Wirkung des Chininsulfats, zahlreiche organische Verbindungen auf ihre Tätigkeit geprüft worden, melanotische Vorgänge an Kartoffelstücken hervorgerufen. Wir wenden uns nun nochmals zu den Chininsalzen zurück und wollen kurz auf die Wirkung eines biologisch sehr interessanten Chininsalzes eingehen, nämlich auf die Wirkung von Chininkakodylat.

Zum Vergleich wurde Natriumkakodylat herangezogen; ferner wurden die Chininkakodylate kombiniert mit einem ausgesprochenen Zellstimulans, nämlich mit Tonophosphan.

Da namentlich Natriumkakodylat alkalisch reagiert, folgen hier auch einige Messungen der p_H-Werte.

m/20	Chininkakodylat	p_H 6,9
m/320	„	p_H 6,24
m/20	Natriumkakodylat	p_H 7,7
m/120	„	p_H 7,2

Nach dieser kurzen Vorbemerkung folgt der Versuch mit Kakodylaten vom 27. November 1924.

[1]) *O. Loew*, Die chemische Energie der lebenden Zellen, 2. Aufl. Stuttgart 1906.

Beginn 27. November 1924, vormittags 10 Uhr 30 Minuten.

Medium	Beobachtungen unmittelbar n. Zugabe	Beobachtungen nachmittags	Beobachtungen tags darauf
n/5 Na-Kakodylat	Hauch von Rötung	Steckenbleiben	schwach Schwärzung
n/10 "			" "
n/20 "			negativ
n/40 "			"
n/80 "			"
n/160 "			"
n/10 Chinin-Kakodylat	ohne Farbänderung	mächtig einsetzende Reaktion	außerordentl. stark tiefe Schwarzfärbung
n/20 "			" "
n/40 "			" "
n/80 "			nachlassend. Färbung
n/160 "			" "
n/320 "			
Wasser	negativ	negativ	negativ
Brenzcatechin	spontan	fortschreitend	weiter fortschreitend
Hydrochinon	rasch einsetzend	fortschreitend (langsamer wie Brenzcatechin)	fortschreitend
Chinin	wie üblich ohne sichtbare Reaktion	—	starke Schwärzung
Chinin + 2 Ampullen Tonophosphan	—	—	keine Schwärzung
Chinin + 1 Ampulle Tonophosphan	—	—	—
Sublimat	langsam einsetzend	—	Schwärzung
KNO_3	wie üblich	—	

Chininkakodylat übertrifft an Wirkungstiefe alle bis jetzt erprobten Chininverbindungen. *Tonophosphan hemmt die Chininwirkung.*

An diesen Versuch schließen wir sofort die wichtige Frage der *Retardierung* und *Hemmung* der Chininwirkung an.

Wir wissen schon aus früheren Versuchen, daß dem Mangansulfat bereits in schwachen Konzentrationen von n/100 eine starke hemmende Wirkung zukommt. Die Fortführung der Versuche zeigte nun, daß auch das Eisensulfat die Chininwirkung paralysiert. Ein besonderes Interesse verdienen aber die Phosphate. Größere Dosen *von primärem* Natriumphosphat retardieren ebenfalls die Chininwirkung. Wir brachten namentlich dem Natriumphosphat deshalb ein erhöhtes Interesse entgegen, weil *Matko*[1]) die Beobachtung machte, daß Harn imstande ist, die hämolytische Wirkung des Chinins zu hemmen. Diese Eigenschaft beruht auf dem Gehalt des Harns an *einfach sauren Phosphaten.* In weiterer Verfolgung dieser Tatsache stellte *Matko* dann fest, daß man mittels intravenöser Injektion von Dinatriumphosphat das Schwarzwasserfieber bei Malaria erfolgreich bekämpfen kann. Er berichtet von einem Falle von chronisch rezidivierender Malaria tertiana und tropica bei dem im Anschluß an eine Chininmedikation Schwarzwasserfieber auftrat. Auf intravenöse Injektion von 200 ccm einer 2,5proz. Natriumphosphatlösung verschwand die Hämaturie und Albuminurie auf mehrere Stunden. Denselben Erfolg zeitigte eine zweite Injektion.

[1]) Siehe Mercks Ber. 31 u. 32, 359, 1917/18.

Dauernd war dieser Erfolg aber erst nach einer Injektion von Natriumphosphat und Kochsalz. Der Autor injizierte 120 ccm einer 6 proz. Lösung, welche beide Mittel im gleichen Verhältnis enthielt. Hierauf stand die Hämolyse sofort und dauernd.

Während wir mit primärem Phosphat Hemmung erzielen konnten, ergaben Versuche mit sekundärem Natriumphosphat keine Hemmung der Chininwirkung, doch lassen vielleicht andere Konzentrationen noch Wirkung erkennen.

Versuch mit Phosphaten vom 12. November 1924 zur Demonstration der Chininhemmung durch Phosphate.

Beginn 12. November 1924, nachmittags 3 Uhr.

Nr.	Medium	Ergebnis am 13. XI. 1924.
1	0,1 proz. Chininsulfat, Phosphatzusätze . .	Schwärzung wie üblich
2	25 ccm Chinin + 1 ccm einer 2 proz. primären Natriumphosphatlösung	mit steigender Konzentration des Natriumphosphates deutlich nachlassende Schwärzung
3	Chinin + 3 ccm } einer 2 proz. primären	
4	,, + 5 ,, } Natriumphosphatlösung	
5	,, + 1 ,, } einer *sekundären* 2 proz.	mit steigender Konzentration deutlich ansteigende (namentlich in der Tiefe) Färbung
6	,, + 3 ,, } Natriumphosphatlösung	
7	,, + 5 ,,	
8	,, + 1 ,, } einer *tertiären* 2 proz.	in der Mitte die tiefste Scwärzung
9	,, + 3 ,, } Natriumphosphatlösung	
10	,, + 5 ,,	
11	,, + 1 ,, } einer 2 proz. *primären*	mit steigender Konzentration *nachlassende* Schwärzung
12	,, + 3 ,, } *Kali*phosphatlösung	
13	,, + 5 ,,	
14	,, + 1 ,, } einer 2 proz. *sekundären*	mit steigender Chininkonzentration *ansteigende* Schwärzung
15	,, + 3 ,, } K_2HPO_4	
16	,, + 5 ,,	

Dagegen wirken Eisensalze und Mangansalze stark retardierend, während Alkalisalze wirkungslos sind, wie folgender Versuch zeigt:

Versuch vom 11. November 1924.

Nr.	Kartoffelstücke in	Beobachtungen am 12. XI. 1924
1	Chinin + 1 ccm } n/10 Mangansulfatlösg.	keine Schwärzung
2	,, + 5 ,, } auf 25 ccm	
3	,, + 10 ,,	
4	,, + 1 ,, n $NaNO_3$	stark positiv
5	,, + 1 ,, n NaBr	
6	,, + 1 ,, n KNO_3	
7	0,2 proz. Eisensulfat	negativ, oben Reduktion!
8	0,1 ,, ,, ...	
9	5 ccm von 0,2 proz. Eisensulfat auf 25 ccm Chinin	negativ
10	Spur Eisensulfat in Chinin	Hauch einer Färbung

Versuche, durch Organextrakte beliebiger Art die Chininwirkung oder Hydrochininwirkung zu verhindern bzw. Antienzyme aufzufinden, waren nicht von Erfolg begleitet, wie die folgenden Versuche mit Pferdeserum (alt), Insulin Fornet und Organdialysaten zeigten.

Versuch vom 10. November 1924.

Nr.	Kartoffeln in	Ergebnis am 11. XI. 1924
1	Insulin *) allein	negativ
2	„ + 0,12 proz. Hydrochinon	stark positiv
3	Pferdeserum allein	schwach positiv
4	0,12 proz. Hydrochinon + Pferdeserum	Reaktion erscheint einige Augenblicke später wie bei Hydrochinon allein, übertrifft aber nächsten Tag sogar das Hydrochinon
5	0,03 „ „ + „	
6	Hydrochinon allein	stark positiv
7	Primulysat **) allein	oben leichte Bräunung
8	Polygalysat allein	—
9	Chinin + Polygalysat	+
10	„ + Primulysat	
1	Leberextrakt	—
2	Herzmuskelextrakt	—
3	Chinin	+++
4	„ + Leberextrakt	++
5	„ + Herzmuskelextrakt	—
6	„ + Leberextrakt	+
7	„ + Herzmuskelextrakt	+
8	„ + Tonophosphan	±
9	Tonophosphan allein	—
10	Chinin (0,1 proz.)	+++
11	„ + Tonophosphan ***) 1 Ampulle	—
12	„ + „ 3 Tropfen	± ±
13	„ + „ 2 „	++ ++
14	„ + „ 1 „	+++ (Stimulans?)

*) Insulin Fornet des Instituts für Mikrobiologie Saarbrücken 1 Pille auf 20 ccm. Insulin Fornet ist keimungsphysiologisch sehr wirksam. — **) Überlassen von der Ysatfabrik Bürger, Wernigerode. — ***) Tonophosphan, ein offenbar sehr wirksames Zellstimulans, freundlich überlassen von Leopold Casella & Co., Frankfurt am Main.

Die Hemmung der Chininwirkung durch Phosphat (organisches und anorganisches), durch Mangan- und Eisensulfat ist aus obigem — etwa 1 mg Tonophosphan in etwa 8 ccm Chininsulfat (0,1 proz.) hemmt noch stark — deutlich.

Versuche mit verschiedenen Kartoffelsorten.

Daß sich bei gesunden Pflanzen die Stärke der Melaninbildung etwas verschieden verhält, haben wir schon oft beobachtet. Im folgenden bringen wir das Verhalten einiger Kartoffelsorten gegen Chinin, n KNO_3, Tyrosin und Hydrochinon. Die Versuche ergaben nur graduelle Unterschiede.

Sortenprüfungsversuch mit Kartoffelstücken vom 18. November 1924.

Nr.		Beobachtung unmittelbar nach Versuchsbeginn	Beobachtungen am 19. XI. 1924
		Sorte: Industrie.	
1	Chinin (0,1 proz.) . . .	—	++
2	n KNO_3	—	±
3	Tyrosin	träge	sehr weit fortgeschritten
4	Hydrochinon *)		
		Pepo.	
5	Chinin sulf.	—	+++
6	n KNO_3	—	++
7	Tyrosin	—	Reaktion tief
8	Hydrochinon	stürmisch	
		Kaiserkrone.	
9	Chinin sulf.	—	++
10	n KNO_3	—	±
11	Tyrosin	—	mächtige Reaktion
12	Hydrochinon	träge	
		Jubel.	
13	Chinin	—	+++
14	n KNO_3	—	+
15	Tyrosin	—	fortschreitend
16	Hydrochinon	rasch einsetzend	
		Zwickauer Frühe.	
17	Chinin sulf.	—	+++
18	n KNO_3	—	—
19	Tyrosin	—	wie überall
20	Hydrochinon	träge	
		Alma.	
21	Chinin (0,1 proz.) . . .	—	++
22	n KNO_3	—	+
23	Tyrosin	—	mächtig
24	Hydrochinon	rasch	
		Wohltmann.	
25	Chinin sulf.	—	++
26	n KNO_3	—	+
27	Tyrosin	—	wie überall
28	Hydrochinon	mäßig	
		Vater Rhein.	
29	Chinin	—	+++
30	n KNO_3	—	+
31	Tyrosin	rasch	Hydrochinon hier weniger mächtig
32	Hydrochinon		
		Parnassia.	
33	Chinin	—	++
34	n KNO_3	—	+
35	Tyrosin	äußerst stürmisch	mächtig
36	Hydrochinon		
		Blochinger.	
37	Chinin	—	++
38	n KNO_3	—	++
39	Tyrosin	spontan	weiterschreitend
40	Hydrochinon		

*) Die organischen Verbindungen in 0,1 proz. Lösung angewendet.

Nr.		Beobachtung unmittelbar nach Versuchsbeginn	Beobachtungen am 19. XI. 1924
		Sorte: Dr. Baumann.	
41	Chinin	—	++
42	n KNO_3	—	++
43	Tyrosin	spontan	weiterschreitend
44	Hydrochinon		
		S 16 Weihenstephan.	
45	Chinin	—	+
46	n KNO_3	—	+
47	Tyrosin	explosiv	mächtig
48	Hydrochinon		
		Unbekannt.	
49	Chinin	—	++
50	n KNO_3	—	+
51	Tyrosin	rasch	sehr tiefe Wirkung
52	Hydrochinon		
		Schrobenhausener Moor-Herkunft.	
53	Chinin	—	+++
54	n KNO_3	—	++
55	Tyrosin	rasch	wie überall
56	Hydrochinon		

Trotz zahlreicher Versuche unsererseits wollen wir es unterlassen, aus diesen Versuchen irgendwelche Schlüsse zu ziehen. Die Möglichkeit einer diagnostischen Verwertung muß erst durch weitere Versuche erwiesen werden.

Da gerade die Kartoffel zur Durchführung der Chininproben geeignet ist, und da die Kartoffel andererseits zahlreiche Krankheiten aufweist, die unter dem Namen *Abbaukrankheiten* zusammengefaßt werden, so wurden Kartoffelsorten in *gesundem* und *krankem Zustande der Chininprobe unterworfen.* Wie die Versuche ergaben, scheint eine Diagnostik des Kartoffelabbaus durch die Chininprobe undurchführbar zu sein. Einige Versuche wollen wir im folgenden anführen.

Versuche zur Anwendung der Reaktion für die Diagnostik des Kartoffelabbaues.

Versuchsbeginn 21. November 1923.

Beurteilung der Schwärzung nach 48 Stunden.

Nr.	I. Sorte	
	Wiedemann, abgebaute Pflanze	*Pepo*, gesunde Pflanze
1	++	++
2	+++	++
3	+++	+++
4	++	+++
5	+	+
6	+++	+

Versuch vom 28. November 1923. Grad der Schwärzung nach 18 Stunden.

Nr.	I. Sorte	
	Wiking, abgebaut	*Wiking*, gesund
1	+	+++
2	+	+++

Nr.	II. Sorte	
	Industrie, abgebaut	*Industrie*, gesund
1	++	+++
2	++	++
3	++	+

Nr.	III. Sorte	
	Wiking, abgebaut	*Wiking*, gesund
1	+++	++
2	+	++

Eine Diagnostik des Abbaus durch die Chininprobe ist nach diesen Stichproben wenig aussichtsreich.

Versuch mit Blättern von Vicia faba.

Wir haben den letzten Teil der Versuche ausschließlich mit Kartoffelknollen durchgeführt. Nun galt es, die Fühlung mit den einleitenden Versuchen, die mit Laubblättern angestellt wurden, wieder zu gewinnen und zu prüfen, ob außer dem Chinin auch andere Stoffe zur Schwärzung führen, wie es für die Kartoffelknolle festgestellt wurde. Zu den Versuchen wurden Blätter von *Vicia faba* verwendet.

Versuch vom 5. November 1924.

Nr.	Die Blattstiele tauchen ein in	Grad der Schwärzung am 6. XI. 1924
1	Wasser	negativ
2	Sublimatwasser 1:1000	Aderschwärzung
3	Chinin (0,1 proz.)	völlig geschwärzt
4	Hydrochinon	Blattstiel geschwärzt
5	$LiNO_3$	Schwärzung fast so stark wie bei Chinin
6	$NaNO_3$	
7	K_2SO_4	schwache Reaktion
8	NaSCN	deutliche Schwärzung
9	BrK	

Im Gegensatz zu den Kartoffelknollen-Versuchen trat hier auch Rhodanid in Wirkung (Tötung und Gerbstoffwirkung). Wenn Blätter von Vicia faba in geschlossenen Gläsern Toluoldämpfen ausgesetzt werden, so übersteigt Grad und Ausdehnung der Schwärzung alles bisher Beobachtete; wir haben also hier eine vollkommene Parallele zur Toluol-

wirkung bei der Kartoffel. Dagegen fällt die geringe Wirkungsstärke des Hydrochinons bei Blattversuchen mit Vicia faba auf. Blätter, in 0,25 proz. Hydrochinon in Petrischalen gelegt, nehmen erst nach einigen Tagen eine Fleckenbildung an, die allerdings tiefschwarz war und lebhaft an die von dem Pilz Ascochyta hervorgerufene Fleckenkrankheit erinnert. Diese Auffälligkeit führt uns dazu, hier kurz

die Nachahmung von Infektionskrankheitsbildern bei Pflanzen durch Chinin zu behandeln.

Pflanzen, die der Chininprobe unterworfen werden, nehmen häufig Formen und Farben an, die für bestimmte Infektionskrankheiten charakteristisch sind. Wir kennen eine Reihe von Infektionskrankheiten bei Beta, Solanum, Vicia faba, die von einer charakteristischen Schwärzung begleitet sind. Die Krankheitsbilder der Schwarzbeinigkeit der Kartoffel können durch Eintauchen von Pflanzen in Chinin, die Bilder der Bakterien-Ringfäule durch Einlegen von Kartoffelscheiben in Chinin überraschend nachgeahmt werden. Die Bilder, die der Wurzel-

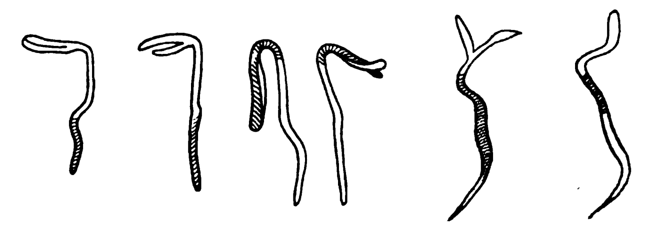


Abb. 8a. Abb. 8b.

a) Durch Pythium de Baryanum infizierte Rübenkeimlinge mit natürlicher Melaninbildung. Nach *Busse*, Arb. Biolog. Reichsanstalt 8, 2, 224, 1911.
b) Künstlich mit Chininzufuhr herbeigeführte Melaninbildung. Original.

brand des Beta-Keimlings hervorruft, sind zum Täuschen ähnlich den Bildern, die am Beta-Keimling entstehen, wenn die Keimwürzelchen in 0,1 proz. Chininsulfat tauchen. Die in Bayern viel erörterte und wenig erforschte „Mergelkrankheit der Rüben" ist häufig mit einer Schwärzung der Blätter verbunden, wie sie durch Eintauchen der Blätter in 0,1 proz. Chininsulfat erhalten wird. Rübenköpfe nehmen, in Chininsulfat eingelegt, das Aussehen von Pflanzen an, die an Herz- und Trockenfäule leiden. Selbst ganze Rüben, die man so behandelt, nehmen Farbe und Einbuchtungen an, die Krankheiten vortäuschen. Bekanntlich wird durch die „Johanniskrankheit" der Wurzelhals von Lupinus angustifolius tief gefärbt, bei Lupinus luteus tritt ein solches Bild nicht auf; die Chininprobe liefert nur bei Lupinus angustifolius positive Ausschläge und versagt bei Lupinus luteus. Am bekanntesten und auch am leichtesten nachahmbar (z. B. Johanniskrankheit) sind die Krankheitsbilder und Schwärzungen, die bei Vicia faba durch die ver-

schiedensten Erreger hervorgerufen werden. Über die Zeit, die bis zum Auftreten der schwarzen Produkte verstreicht, schreibt *Schuster*[1]):

Impft man eine geringe Menge von Bacterium xanthochlorum in den Stengel von Vicia faba, so tritt schon bei gewöhnlicher Zimmertemperatur innerhalb 24 Stunden an der Verwundungsstelle eine pechschwarze Verfärbung auf, die sich auch oben und unten weiter ausbreitet, der Stengel wird schlaff und fällt um. Das Krankheitsbild ist demnach eine Schwärzung der Stengelbasis unter Auftreten einer weichen Fäulnis, die innerhalb 24 Stunden die Stengel zum Umfallen bringen kann. Wenn auch hier wie bei der Schwarzbeinigkeit der Kartoffel anzunehmen ist, daß mehrere Bakterien das gleiche Krankheitsbild erzeugen können, so muß Bacterium xanthochlorum wegen seiner Wirkung doch in erster Linie als primärer Erreger der Schwarzbeinigkeit der Saubohne angesprochen werden. Auch Bacterium phytophtorum vermag, wie *Appel* gezeigt hat, Schwärzung und Fäulnis bei Vicia faba hervorzurufen, wie ich mich jedoch durch Versuche mit dem *Appel*schen Bacterium überzeugt habe, verläuft der Krankheitsprozeß hier langsamer und es dauert mindestens drei Tage, bis die Pflanzen umfallen.

Die Schwarzfärbung verschwindet auch bei längerem Aufenthalt der Objekte in absolutem Alkohol nicht und ist auf ein oxydierendes Enzym (Tyrosinase) zurückzuführen. Wenn man Bacterium xanthochlorum aus Vicia faba-Stempeln isoliert und auf alkalischem Kartoffel-Agar bei 30° kultiviert, so entwickelt sich eine schwach rote Färbung, die bald nachher schwarz wird, wenn man Paraphenylendiamin und ·naphtol (*Spitzers* Reaktion) zusetzt; gibt man eine 1- bis 5proz. Tyrosinlösung zu der Bakterienkultur, so nimmt sie schneller eine rotschwarze Farbe an, als ohne diesen Zusatz. Diese Reaktionen zeigen, daß Bacterium xanthochlorum Tyrosinase ausscheidet. Doch hängt die Produktion dieses Enzyms von bestimmten, nicht näher bekannten Bedingungen ab; denn auf anderen Pflanzen tritt Fäulnis ohne Schwarzfärbung auf. Bei dem Zustandekommen der Schwärzung wirkt mehr der Chemismus der betreffenden Pflanze als der Chemismus des Erregers mit.

Die Erprobung der Methodik für andere pflanzliche Enzyme.

Wir versuchten beim Abschluß der Tyrosinaseversuche, unsere Methodik auch für den Nachweis anderer Enzyme dienstbar zu machen, und konnten feststellen, daß z. B. die Reduktion des Methylenblaus durch Reduktasen so schön und sicher an Kartoffelstückchen zu zeigen ist, daß die Methodik als *Vorlesungsversuch* dienen kann.

[1]) *J. Schuster*, Zur Kenntnis der Bakterienfäule. Aus Beiträge zur Kenntnis der Kartoffel 8. Berlin 1912.

In Wasser bleibt das obere Drittel der Kartoffel tiefblau, die unteren Drittel bleichen völlig.

Die Methodik verspricht für andere Enzyme gute Dienste zu tun. Gleichzeitig kann bei weiterer Ausdehnung der Fragestellung die Neutralsalzwirkung mit Hilfe der beschriebenen Methodik gut studiert werden.

Zusammenfassung.

1. Die bisherigen Untersuchungen über „*Pflanzliche Tyrosinasen*“ wurden ausschließlich mit pflanzlichen *Organextrakten*, insbesondere mit *Tyrosinlösungen* durchgeführt. Die hier beschriebenen Versuche bedienten sich einer ganz anderen Methodik, die ihren Ausbau der Beobachtung verdankt, daß *Organe oder Organteile gewisser Pflanzenarten in 0,1 proz. Chininsulfat eine Schwärzung erleiden.*

2. Diese Wirkung der Chininsalze ist an eine verhältnismäßig *hohe* Chininkonzentration gebunden (von 0,05 Proz. ab). Das Enzym wird durch die hohe Chininkonzentration, welche die Zelle lähmt und die *Zellstruktur stört*, aus seiner *Abhängigkeit* vom Gesamtgeschehen der Zelle *losgelöst* (*Freilauf der Tyrosinase*). In den normalen Zellen herrscht ein äußerst labiles, sorgfältig ausgeglichenes Gleichgewicht, so daß jede Sonderfunktion ausgeschaltet und jeder Prozeß dem Gesamtinteresse untergeordnet wird.

3. Die Tyrosinasefunktion in unseren — meist mit Kartoffelstücken durchgeführten — Versuchen ist vorzugsweise postmortal, namentlich bei Verwendung hoher Chininkonzentrationen. Doch können wir mit gewissen Stimulantien, namentlich mit dem hochwirksamen *Tonophosphan*, den *Widerstand der Zelle gegen das Chinin organisieren*, die *Zellstruktur stützen*, ihre *Funktionen beleben*, wenn die Ghininkonzentration 0,1 Proz. nicht überschreitet. Den Phosphaten scheint eine ähnliche, wenn auch bedeutend geringere Fähigkeit innezuwohnen.

4. Ob Zusammenhänge mit dem *Schwarzwasserfieber*, das beim Menschen unter bestimmten Bedingungen und nach bestimmten Chininmedikationen auftritt, bestehen, wird sich zeigen müssen. Jedenfalls haben auch in der Therapie des Schwarzwasserfiebers die Phosphate eine günstige Wirkung auf den Organismus ausgeübt.

5. Die Loslösung des Enzyms aus dem Zellgefüge wird ähnlich wie durch Chinin durch den *natürlichen Zelltod* vollzogen (Pflanzen, die in Chinin die ausgedehntesten Schwärzungen liefern, sind immer solche, die nach ihrem natürlichen Absterben Schwärzungen annehmen), desgleichen durch den *Kältetod der Zelle*, durch den *Hitzetod der Zelle* (die Hitzegrade dürfen fast bis auf 90° ansteigen), durch die *Narkose der Zelle* (Toluol und Xylol, jedoch nicht durch Äther und nicht durch Chloralhydrat), durch *Alkohol* und *Coffein*, durch *Sublimatwasser* und durch andere Stoffe.

6. *Bedingung dabei ist, daß das Enzym nicht selbst angegriffen wird.* Salze der *Erdalkalien* führen *nicht* zur Melaninbildung. In hohen Konzentrationen flocken sie allem Anschein nach das Enzym, in niederen Konzentrationen vermögen sie dem Enzym nicht zum Freilauf zu verhelfen, weil sie die Zellstruktur intakt lassen. Die unverletzte Zellstruktur hält das Enzym im Zügel. Wenn Zusatz von Spuren von Eisen- und Mangansalzen zu Chinin die Melaninbildung verhindert, so muß noch entschieden werden, ob sie *retardierend* auf das *Enzym* selbst oder *organisierend* auf die *Abwehrkräfte der lebendigen Substanz* wirken.

7. *Alkalisalze* in Normal- und höheren Konzentrationen *führen immer zur Melaninbildung*. Niedriger konzentrierte Lösungen von Alkalisalzen bedürfen einer *längeren Zeitdauer* zur Einleitung der Melaninbildung. Der *Einfluß des Anions* ist deutlich am Zustandekommen eines bestimmten *Farbtones* zu erkennen.

8. Der *Farbton* ist, wie zuerst *Haehn* richtig gezeigt hat, der Ausdruck eines bestimmten *Dispersitätsgrades* des melanotischen Farbstoffs.

9. Von den *Dioxybenzolen* bewirken Hydrochinon und Brenzcatechin ein *spontanes* Auftreten von Farbstufen, dagegen nicht Resorcin. *Tyrosin*, die Muttersubstanz der Tyrosinasenmelanine, ist *ebenso momentan* wirksam.

10. Mit Hilfe der *Chininmethode* können *Bilder* von *pflanzlichen Infektionskrankheiten nachgeahmt werden* (Schwarzbeinigkeit der Kartoffel, Wurzelbrand der Rübe, Johanniskrankheit der Leguminosen).

Die Arbeit wird fortgesetzt.

Über die Oxydation der A-Vitamine im Milchfett beim Buttern.

Von

J. Birger Platon.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 26. Dezember 1924.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Durch frühere Untersuchungen [*Drummond* und *Coward* (1), *Hopkins* (2)] wurde konstatiert, daß die Vitamine der A-Gruppe an der Luft unter gewissen Bedingungen oxydiert und zerstört werden. Während also, wenn Oxydationsmöglichkeit ausgeschlosesn ist, die A-Stoffe im Butterfett eine 12stündige Erhitzung desselben bis auf 120° C vertragen, ohne dabei nennenswert geschwächt zu werden, werden sie bei gleichzeitiger Durchlüftung schon nach 4 Stunden vollständig zerstört. Auch bei 37° C verliert das Butterfett, wenn es der Einwirkung der Luft ausgesetzt wird, nach und nach seine A-Stoffe, während man unter sonst gleichen Bedingungen bei Luftabschluß keine Herabsetzung des A-Vitamingehalts wahrnehmen kann (*Drummond* und *Coward*, l. c.).

Aus den Untersuchungen *Mc Collums* (4) scheint hervorzugehen, daß in den Molken ungefähr die Hälfte der A-Stoffe der Milch wiedergefunden werden und daß also nicht die ganze Menge der A-Stoffe an die Fettkügelchen gebunden ist. Dies wird auch durch Beobachtungen von *Sherman*, *MacLeod* und *Kramer* (7), daß abgerahmte Milch einen bedeutend größeren Gehalt an A-Stoffen aufweist als ihrem Fettgehalt entspricht, bestätigt. Was den A-Stoffreichtum der Butter, verglichen mit dem der Milch betrifft, führt *v. Wendt* (8) an, „daß viele Versuche zeigen, daß die Butter allerdings bedeutend A-Vitaminreicher ist als die Milch, der Unterschied im Vitamingehalt erweist sich aber bei langem nicht so groß als man erwarten sollte, wenn die Butterbereitung nicht mit einer Verminderung des A-Stoffgehalts verbunden wäre. Nach einigen Versuchen sollte die Herabsetzung so groß sein, daß die Butter nicht mehr als 1/4 bis 1/5 der ursprünglichen Vitaminmenge des Milchfettes enthalten sollte.“ Es lag nahe an der

Hand, diese Verminderung einer während der Verarbeitung der Milch erfolgenden Oxydation der A-Stoffe zuzuschreiben, und von den verschiedenen Operationen wurde gerade das Buttern als die für die A-Vitamine verhängnisvollste Operation angesehen, da während des Butterns das Fett mit der Luft im Butterfaß in besonders intime Berührung kommt (*v. Wendt*, l. c.). *Rahn* (6) nimmt auf Grund vieler früher bekannten Tatsachen an, daß die Butterbildung so vor sich geht, daß der die Fettkügelchen umgebende Schaumstoff sich an der Oberfläche der Luftbläschen ansammelt, wobei die Fettkügelchen mitgerissen werden und sich in den Schaumlamellen ablagern. Durch das weitere Bearbeiten des Rahms erstarrt dann der Schaumstoff und das Fett ballt sich zu immer größeren Butterklümpchen zusammen. Bei diesen sich abspielenden Vorgängen kommen also die Fettkügelchen mit ihren großen Oberflächen wenigstens während einer kürzeren Zeit in direkte Berührung mit der Luft, wodurch die Bedingungen für eine Oxydation sehr günstige zu sein scheinen.

Nach einer unlängst erschienenen Abhandlung von *Hunziker* (3) hat man an mehreren Orten in Amerika diese vermeinte Oxydation und damit verbundenen Verlust an A-Vitaminen durch Ausführung des Butterns in einer Kohlensäureatmosphäre zu vermeiden versucht. „Carbonated butter" wird dann als ein vitaminreicheres und haltbareres Produkt als die in gewöhnlicher Weise gewonnene Butter verkauft. Wie *Hunziker* hervorhebt, hat man indessen für dieses Verfahren keine Stütze durch Resultate direkt angestellter vergleichender Versuche gehabt. Er ist im Gegenteil der Ansicht, daß viele Verhältnisse dafür sprechen, daß eine Verdrängung der Luft durch Kohlensäure bei der Butterung für die Konservierung der Vitamine des Milchfettes keine Bedeutung besitzt. Und obwohl während des Butterns, wie oben angeführt wurde, in gewissen Hinsichten für eine Oxydation günstige Umstände vorhanden sind, erscheint eine solche aus anderen Gründen ziemlich unwahrscheinlich.

Nach *Drummond* und *Coward*, l. c., ist eine 12stündige Durchlüftung bei 80^0 C erforderlich, um die A-Stoffe der Butter zu zerstören. Eine Butterung wird gewöhnlich bei 12 bis 18^0 C ausgeführt und nimmt nur ausnahmsweise längere Zeit als eine bis einige Viertelstunden in Anspruch, und unter diesen Umständen scheint ein größerer Verlust an A-Vitaminen kaum zu erwarten.

Zur Erforschung dieser praktisch und ökonomisch wichtigen Frage führte ich auf Vorschlag von Herrn Professor Dr. *Widmark* vergleichende Fütterungsversuche mit jungen Ratten aus, um eine eventuelle Verschiedenheit im Zuwachs bei teils mit auf gewöhnliche Weise, teils mit in Kohlensäureatmosphäre dargestellter Butter gefütterten Tieren festzustellen.

Methodik.

Die Zubereitung der Butter. Die Herstellung der zu den Versuchen verwendeten Butter geschah dank der Liebenswürdigkeit des Vorstehers Herrn Professor Dr. *Rosengren* in der Versuchsmolkerei des landwirtschaftlichen Instituts zu Alnarp. Die Butterungen wurden in einem früher im Butterbetrieb verwendeten Handbutterfaß mit einem Rauminhalt von 12 Litern ausgeführt. Das Faß bestand aus einem Eisenblechzylinder, durch dessen Mitte eine Achse ging, die mit einer mit dem Faß zusammenhängenden Hülse umkleidet war. Vom oberen Ende der Achse, die durch ein passendes Loch im Deckel ein wenig hervorragt, reichen zwei Blechflügel in das Faß hinunter. Diese mit Flügeln versehene Achse wurde unter Vermittlung eines unter dem Faß gelegenen Zahnrades mit einer Kurbel in Rotation versetzt und so die Sahne bearbeitet.

Bei den Butterungen in Kohlensäureatmosphäre wurde aus einer Bombe mittels eines Rohres durch den Boden des Butterfasses Kohlensäure eingeleitet. Vor dem Beginn der Bearbeitung wurde während etwa 15 Minuten ein kräftiger Kohlensäurestrom unter langsamem Umdrehen der Kurbel durch die Sahne geblasen. Ein besonderes Auspumpen der in der Sahne gelösten Luft, wie es *v. Wendt* empfiehlt, wurde jedoch nicht vorgenommen. Da die Sahne kurz vor dem Buttern pasteurisiert worden war und dann, wie oben angegeben, Kohlensäure durchgeleitet wurde, dürften nur noch sehr geringe Mengen Luft zurückgeblieben sein. Nachdem die Luft auf diese Weise entfernt worden war, wurde zur Verhinderung von Luftwechsel ein dickes feuchtes Tuch über den Deckel ausgebreitet. Nach beendigter Butterung wurde die Buttermilch mit einem Saugheber abgehebert und die Butter im Faß dreimal mit Wasser gewaschen. Das Kneten wurde unter Wasser mit den Händen ausgeführt und wurde während sämtlicher Operationen mit dem Einblasen eines kräftigen Kohlensäurestromes fortgefahren. Beide Buttersorten wurden unmittelbar nach dem Kneten möglichst dicht in Glasgefäße gepreßt, die, mit Pergamentpapier überbunden, während der Versuchszeit bei einer Temperatur von ungefähr 12° C aufbewahrt wurden. Nur sechsmal standen die Gläser bei 0 bis 5° über Nacht.

Bei jeder Butterung, die 15 bis 20 Minuten dauerte, wurden 4 Liter süße Sahne verarbeitet und betrug die Anfangstemperatur derselben 13° C. Die beiden Vergleichsbutterungen wurden gegebenenfalls jedesmal mit verschiedenen Portionen desselben Rahmes und unmittelbar nacheinander ausgeführt.

Die Fütterungsversuche. Diese wurden in der Hauptsache nach der Methode von *Drummond* zur quantitativen Schätzung der A-Stoffmengen ausgeführt. Von den für diese Versuche verfügbaren zehn Ratten gehörten sechs, nämlich Nr. 296, 297, 298, 300, 304 und 305

(im folgenden als Gruppe I bezeichnet) demselben Wurf, die übrigen, Nr. 306, 308, 310 und 311 (Gruppe II) einem anderen, etwas späteren Wurf an.

Sämtliche Tiere wurden ungefähr im Alter von 4 Wochen auf A-Vitaminfreie Grundnahrung gesetzt, die die folgende Zusammensetzung hatte: 470 Teile Reismehl, 180 Teile Casein, 50 Teile Hefe und 50 Teile Nährsalzmischung nach der Vorschrift von *Mc Collum* und *Davis* (5). Aus dieser Mischung und außerdem noch 1 ccm Arachisöl pro Tier und Tag wurde ein Teig hergestellt. Nachdem der Zuwachs bei einem Körpergewicht von ungefähr 70 g aufgehört hatte, wurde den Ratten eine Zulage von verschiedenen Mengen Butter gegeben.

Das Abwägen der Tagesrationen erfolgte unmittelbar vor der Fütterung, und täglich wurde die oberste Schicht der Butter in den Gläsern entfernt. Sämtliche Tiere wurden wöchentlich zweimal gewogen.

Von den Ratten der Gruppe I erhielten vom 24. September an 298 0,2 g Kohlensäurebutter, 300 und 305 0,2 g Luftbutter, die am 24. September 1924 zubereitet wurde. Vom 27. September an erhielten 296 und 297 0,1 g Kohlensäurebutter, 304 0,1 g Luftbutter, die am 27. September gewonnen wurde. Vom 4. Oktober an erhielten sämtliche Ratten dieser Gruppe 0,05 g 296, 297 und 298 Kohlensäurebutter, die übrigen Luftbutter vom 27. September, welche Butter während der ganzen weiteren Versuchszeit verwendet wurde. Nach dem 9. November wurde die Tagesration sämtlicher Tiere auf 0,075 g erhöht. In der Gruppe II erhielten vom 13. Oktober an 306 und 310 0,05 g Kohlensäurebutter, 308 und 311 gleichviel Luftbutter. Nach dem 30. Oktober wurde die tägliche Ration um die Hälfte vermindert. Die für diese Gruppe verwendete Butter wurde am 13. Oktober zubereitet.

Resultate.

Des begrenzten Tiermaterials halber, das mir zu dieser Untersuchung zu Gebote stand, mußte das für den Zuwachs erforderliche Butterminimum an denselben Tieren, die zu den eigentlichen Versuchen benutzt wurden, festgestellt werden. Daher wurden die Ratten von Beginn an mit verhältnismäßig großen Butterquantitäten gefüttert. Als diese sich als den Zuwachs induzierende Mengen bewährt hatten, wurden die Rationen vermindert, bis die Tiere wieder keine oder nur geringe Gewichtszunahme zeigten, um danach bei Gruppe I wieder unbedeutend vermehrt zu werden, wobei die Ratten aufs neue an Gewicht zunahmen.

Da wegen der großen Variationen im Vitamingehalt bei zu verschiedenen Zeiten gemachter Butter (vgl. unten), während des größten Teiles oder sogar der ganzen Versuchszeit Butter derselben Butterung verwendet werden mußte, können die hier erhaltenen Resultate auch

über die Haltbarkeit der Vitamine in der Butter während der Lagerung etwas aussagen.

Wie an den in den Abbildungen wiedergegebenen Gewichtskurven ersichtlich ist, kann praktisch genommen im Gehalt an zuwachsfördernden A-Stoffen bei auf oben geschilderte Weise gewonnener Butter kein Unterschied konstatiert werden. Sämtliche Kurven verlaufen im allgemeinen ziemlich gleichförmig.

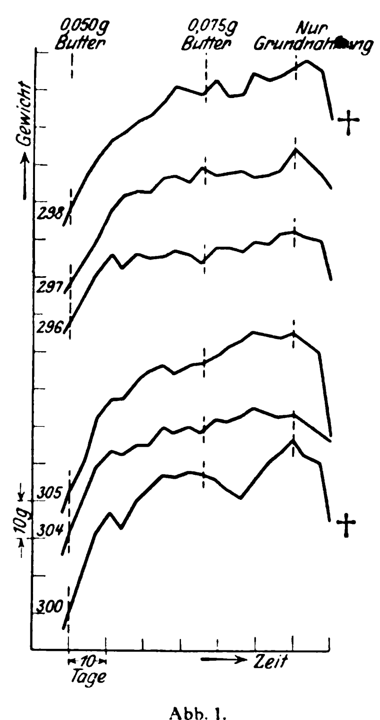


Abb. 1.
Die Wachstumskurven der Ratten der Gruppe I während der letzten Fütterungsperioden.

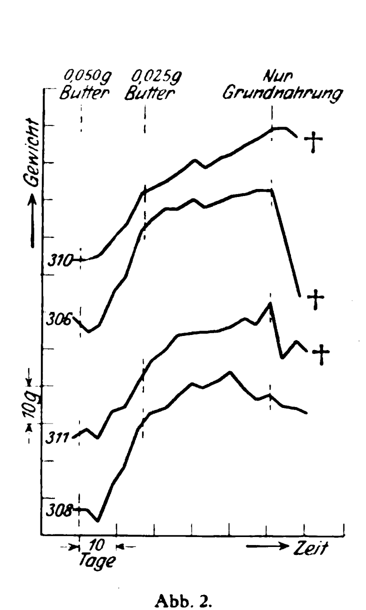


Abb. 2.
Die Wachstumskurven der Ratten der Gruppe II während der ganzen Versuchsdauer.

Bemerkenswert sind die geringen Buttermengen, die erforderlich waren, um eine Gewichtszunahme der Ratten zustande zu bringen. Die hier für eine Vitamineinheit gefundenen Werte weichen beträchtlich von den früher für Butter gefundenen ab. *Zilva* und *Miura* (9) geben die für den normalen Zuwachs junger Ratten erforderliche Menge Butter zu 0,2 bis 0,4 g an. Diese variiert je nach der Rasse der milchliefernden Kühe, der Fütterung derselben usw. Bei den hier mitgeteilten Versuchen wurde dagegen schon bei einer täglichen Ration von nur 0,075 (Gruppe I) bzw. 0,025 g (Gruppe II) Zuwachs erzielt.

Zur Zeit meiner Butterungen gingen die Kühe auf die Weide. Die von oben genannten Forschern angegebenen Verschiedenheiten im

A-Vitamingehalt der Butter je nach der Ausfütterung, Rasse usw. der milchliefernden Kühe, welche Beziehungen noch nicht als völlig klargelegt betrachtet werden können, könnten also die Ursache der abweichenden Resultate bilden.

Eine andere Ursache könnte die sein, daß die von mir verwendete Grundnahrung nicht vollständig frei von A-Stoffen gewesen ist, trotzdem das darin vorhandene Casein wiederholt gefällt und mit Alkohol und Äther extrahiert wurde und darauffolgendes 48stündiges Erhitzen im Trockenschrank bei 100° C stattgefunden hat. Um darüber Klarheit zu erhalten, wurden am 3. Dezember sämtliche Versuchstiere auf Grundnahrung allein gesetzt.

Nach wenigen Tagen erkrankten alle Ratten der Gruppe II an hochgradiger Xerophthalmie, und wie aus den Kurven hervorgeht, nahmen sämtliche Tiere an Gewicht ab. Nach 10 Tagen starben fünf Ratten. Aus diesen Erscheinungen geht hervor, daß die Grundnahrung A-Vitaminfrei war.

Es fällt ferner auf, daß der Vitamingehalt der beiden Butterproben, die mit einer Zwischenzeit von nur wenigen Wochen zubereitet wurden, einen so großen Unterschied aufweist. Vielleicht ist dieser Unterschied auf eine verschiedene Vorbehandlung der Milch und der Sahne zurückzuführen. Die Butter für die Gruppe I wurde nämlich aus Milch hergestellt, die vorher einen Regenerativpasteur passierte und danach zentrifugiert worden war. Die Butter, die zur Fütterung der Ratten der Gruppe II diente, wurde dagegen von einer Milch erhalten, die mit einem Rohrgenerativ bis auf ungefähr 60° C vorgewärmt worden war und dann zentrifugiert wurde. Die Sahne wurde dann in einem Blechgefäß im Wasserbad unter Umrühren pasteurisiert[1]). Über den Ursprung und die Vorbehandlung der Milch wurden im übrigen keine Aufzeichnungen gemacht; die Sahne wurde durch Zentrifugieren der in der Molkerei gemischten Milch mehrerer Lieferanten, von zusammen ungefähr 5000 kg täglich, erhalten. Die Absicht mit dieser Arbeit war ja auch nur, den A-Stoffgehalt auf verschiedene Weise gewonnener Butter zu vergleichen.

Zusammenfassung.

Butter wurde teils in Kohlensäureatmosphäre, teils in Luft hergestellt. Der A-Stoffgehalt der auf verschiedene Weise erhaltenen Butter wurde nach der Methode von *Drummond* durch Ausfütterung

---

[1]) Es scheint mir, als ob beim Zentrifugieren der Milch, welches gewöhnlich bei höherer Temperatur erfolgt, eher ein Vitaminverlust zu befürchten sei als beim Buttern. Mit ähnlichen Verhältnissen ist vielleicht auch beim Pasteurisieren zu rechnen, dessen verschiedene Ausführung außerdem zu schwankenden Vitaminverlusten führen könnte.

junger Ratten geschätzt. Ein Unterschied im A-Stoffgehalt konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden.

Die Minimummenge Butter, mit der ein Zuwachs der Ratten erhalten wurde, weicht beträchtlich von den Angaben früherer Autoren ab und wurde zu 0,075 bzw. 0,025 g bei zwei zu verschiedenen Zeiten hergestellten Butterportionen bestimmt. Die Ursachen dazu, wie auch zu den großen Variationen des A-Stoffgehaltes von Butter, die mit einer Zwischenzeit von zwei Wochen zubereitet wurde, wurden nicht untersucht.

Literatur.

1) *J. C. Drummond* and *K. H. Coward*, Biochem. Journ. **14**, 734, 1920. — 2) *F. G. Hopkins*, ebendaselbst **14**, 735, 1920. — 3) *O. F. Hunziker*, Journ. of Dairy Science **7**, 484, 1924. — 4) *E. V. McCollum*, Journ. of biol. Chem. **29**, 341, 521, 1917. — 5) *E. V. McCollum* and *M. Davis*, of Biol. Chem. **20**, 162, 1915. — 6) *O. Rahn*, Kolloid-Zeitschr. **30**, 341, 1922. — 7) *H. C. Sherman*, *E. L. MacLeod* and *M. M. Kramer*, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. **17**, 41, 1920. — 8) *Georg v. Wendt*, Vitaminer, S. 44. Stockholm 1924. — 9) *S. S. Zilva* and *M. Miura*, Biochem. Journ. **15**, 654, 1921.

Untersuchungen über diastatischen Stärkeabbau.

Von

L. de Hoop und J. A. van Laer.

(Aus dem Laboratorium für chemische Technologie der Technischen Hochschule in Delft.)

(Eingegangen am 27. Dezember 1924.)

In einer früheren Veröffentlichung hat einer von uns[1]) verschiedene Angaben über bereits ausgeführte Untersuchungen betreffs der Kristallisationsverzögerungen gemacht, die im Reaktionsprodukt des diastatischen Stärkeabbaues auftraten, als wir trachteten, in diesem eingedampften Reaktionsprodukt Maltose direkt zur Kristallisation zu bringen.

Wir wiesen damals auf die Tatsache hin, daß diese Kristallisationsverzögerungen, die bereits lange bekannt waren[2]), nicht auftraten in von uns bereiteten Gemischen von Maltose mit den uns zur Verfügung stehenden gereinigten Handelsdextrinen, so daß diese Erscheinung der Anwesenheit von weit abgebauten sogenannten Grenzdextrinen von niedrigem Molekulargewicht im Reaktionsprodukt zugeschrieben werden mußte.

Ferner machten wir darauf aufmerksam, daß der Verlauf der Reaktion:

$$(C_6 H_{10} O_5)_x + H_2 O \longrightarrow C_{12} H_{22} O_{11} + \text{Dextrin}$$

trotz den sehr ausgedehnten Untersuchungen auf diesem Gebiete nicht derartig untersucht war, daß mit Sicherheit festgestellt werden konnte, ob bei dieser Reaktion quantitativ Maltose gebildet würde, wenn die Umstände während der Reaktion so günstig als möglich wären.

Wir wiesen auf die widersprechenden Angaben, die von verschiedenen Autoren über diesen Punkt gemacht sind, hin und auf die

---

[1]) Diese Zeitschr. 135, 217, 1923.

[2]) Als Beleg hierfür verweisen wir auf die gebräuchliche Methode der Reindarstellung von Maltose, bei der das Reaktionsprodukt mit Alkohol extrahiert wird; die Maltose geht dann in Lösung, während die Dextrine zurückbleiben. Versuche, diese Extraktion zu umgehen, haben niemals viel Erfolg gezeitigt.

Bedeutung, die einer Lösung dieses Problems für die Stärkechemie zukäme[1]).

Seither ist unsere Kenntnis der Konstitution des Stärkemoleküls durch die bahnbrechenden Untersuchungen von *Lintner*[2]), *Karrer*[3]), *Irvine*[4]) und *Pringsheim*[5]) außerordentlich bereichert worden, so daß wir gegenwärtig wenigstens zu einer allgemeinen Orientierung über dieses Molekül gelangt sind, wenn auch verschiedene Punkte noch nicht ganz aufgeklärt und die Zusammenhänge zwischen den von diesen Forschern erhaltenen Ergebnissen häufig noch nicht hergestellt sind. Die bereits angeführte Abbaureaktion ist von *Lintner*[6]) und von *Pringsheim*[7]) gleichfalls neuerlich und genau studiert worden, aber sie kamen zu keinen übereinstimmenden Ergebnissen.

Während *Lintner* nach langwierigen Untersuchungen zu dem Schlusse gelangte, daß bei dieser Reaktion im günstigsten Falle 86 Proz. Maltose gebildet werden kann, indem ein durch Diastase nicht mehr abbaufähiges Grenzdextrin zurückbleibt, teilte *Pringsheim* mit, daß es ihm gelungen ist, die Reaktion über dieses Stadium hinaus weiterzuführen, bis die ganze Stärke quantitativ in Maltose übergegangen ist.

Eine derartige, abnorm weit durchgeführte Verzuckerung, wie er es ausdrückt „eine Verzuckerung über den Grenzabbau hinaus", wurde von ihm durch Hinzufügung eines sogenannten Komplements zu seinen Malzdiastasen erreicht. Unter Komplement versteht *Pringsheim* ein Koenzym der Diastase, das erhalten wird, indem man Hefe mittels Toluol abtötet und von dieser abgetöteten Hefe einen wässerigen Auszug bereitet, der bei der Verzuckerung dem verwendeten Malzextrakt zugesetzt wird. Durch das Hinzufügen dieses Komplements ist es *Pringsheim* gelungen, in seinen Reaktionsprodukten 100 Proz. Maltose (auf reduktometrischem Wege bestimmt) nachzuweisen. Auch ohne Zusatz dieses Komplements war der von *Pringsheim* angewandte Malzextrakt zweifellos aktiver als der von *Lintner*; ohne Hilfsmittel konnten 96 Proz. direkt nachgewiesen werden, gegenüber dem *Lintner*schen Grenzwert von 86 Proz; *Pringsheims* Werte zeigen also ohne Zweifel starke Übereinstimmung mit denen von *Maquenne*[8]). Hierzu muß bemerkt werden, daß er sich eines speziellen Malzes der „Byk

[1]) *Maquenne* und *Roux*, C. r. **142**, 124, 1906; *Euler* und *Svanberg*, H. **112**, 193, 1920.

[2]) Zeitschr. f. angew. Chem. 1923, Nr. 16, S. 119.

[3]) Helv. **3**, 620, 1920; **4**, 185, 249, 263, 678, 811, 1921; **5**, 129, 1922.

[4]) Address to the Brit. ass. in Hull 1922. Soc. **123**, 898, 1923.

[5]) Die Polysaccharide, 2. Aufl. Berlin, 1923.

[6]) *Lintner* und *Kirschner*, l. c.

[7]) Diese Zeitschr. **142**, 108, 1923; **148**, 336, 1924; Ber. **57**, 1581, 1924.

[8]) *Maquenne*, l. c.

Gulden Werke" bediente, das außerordentlich aktiv zu sein schien; die gefundenen hohen Maltosewerte sind jedoch sehr merkwürdig, um so mehr, als sie mit einem erhöhten Kristallisationsvermögen des Zuckers Hand in Hand gingen.

Pringsheim erklärt die abweichenden Ergebnisse der verschiedenen Bearbeiter durch die Annahme, daß die in den diversen Malzextrakten enthaltenen Mengen des Komplements sehr verschieden sind. Während ein komplementreicher Malzextrakt imstande ist, die bei der Reaktion gebildeten Grenzdextrine anzugreifen und in Maltose umzusetzen, wird ein komplementarmer Malzextrakt dies nicht tun können und daher das Bild des „Grenzabbaues" liefern. Bei diesem „Grenzabbau" entstehen ungefähr 4 Teile Maltose auf 1 Teil Grenzdextrin, die erstere aus der Amylose, das letztere neben Maltose aus dem Amylopektin des Stärkekorns. Auf diese Weise trachtet er seine späteren Untersuchungen seinen früheren anzugliedern. Manches muß natürlich erst noch bestätigt werden.

In der folgenden Untersuchung hatten wir uns das Ziel gesetzt, nachzuprüfen, ob beim diastatischen Stärkeabbau 100 Proz. Maltose überhaupt gebildet werden kann und welcher Wert den gefundenen Reduktionszahlen als Kennzeichen für die Maltosebildung zuerkannt werden darf; überdies wollten wir soweit als möglich den Zusammenhang feststellen zwischen den Untersuchungen von *Maquenne* und *Pringsheim* einerseits und denen von *Lintner* und *Euler* andererseits.

Wir sind nämlich der Meinung, daß die von vielen Bearbeitern angewandte Methode, bei der das gefundene Reduktionsvermögen ohne weiteres in Prozenten Maltose ausgedrückt wird, nur dann zu richtigen Schlußfolgerungen führen kann, wenn die Grenzdextrine nicht oder nur äußerst wenig reduzieren.

Dies ist nun nach *Lintner* nicht der Fall; die durch ihn isolierten und sorgfältig von Maltose befreiten Grenzdextrine hatten noch ein Reduktionsvermögen von 22 Proz., während *Pringsheim* demgegenüber angibt, daß die Grenzdextrine nicht oder kaum reduzieren, da sie mit den von ihm durch Glycerinabbau aus Amylopektin bereiteten nicht reduzierenden Trihexosan identisch seien.

Wir hielten es also für angezeigt, nach einer anderen Methode zu suchen und uns soviel als möglich von der Reduktionsmethode unabhängig zu machen. Eine solche Methode glauben wir in der von *Lintner* zuerst angewandten und durch uns abgeänderten *Pyridin-Alkohol-trennung* gefunden zu haben. Das Reaktionsprodukt des diastatischen Abbaues wird im Vakuum eingedampft und die Konzentration so lange fortgesetzt, bis das Gemisch von Zucker und Dextrinen als ein trockenes, leicht zu verarbeitendes Pulver erhalten wird; die amorphe Substanz kann nötigenfalls über P_2O_5 nachgetrocknet werden. Sie wird hierauf in einer kleinen Menge Pyridin vollständig aufgelöst

und die erhaltene Lösung in 96proz. Alkohol gegossen. Es entsteht dabei ein Niederschlag, der leicht isoliert und untersucht werden kann.

Zuvor hatten wir uns davon überzeugt, daß eine in die gleiche Menge Alkohol gegossene Lösung von Maltose in Pyridin keinen Niederschlag gab. Der Niederschlag, der beim Verarbeiten des Reaktionsproduktes entstand, konnte daher ausschließlich durch die Dextrine verursacht worden sein.

Durch diese Arbeitsweise wird die von *Lintner* angewandte Vergärung des Reaktionsproduktes samt allen damit verbundenen Nachteilen vermieden und ein klares Bild der Dextrinbildung erhalten.

Andererseits zieht auch diese Arbeitsweise zweifellos Schwierigkeiten nach sich. Dazu rechnen wir in erster Linie den schwach basischen Charakter des Pyridins, wodurch chemische Veränderungen der entstandenen Zucker, die besonders bei Rotationsmessungen zu unrichtigen Auffassungen führen können[1]), sicher nicht zu den Unmöglichkeiten gehören. Mit Hilfe des Drehungsvermögens ausgeführte Analysen haben wir denn auch nach Möglichkeit vermieden. In zweiter Linie erwähnen wir die Möglichkeit der Bildung von Doppelverbindungen von Zuckern mit Pyridin, wie sie von *Behrend*[2]) für Glucose beschrieben worden sind. Bei den Beobachtungen mußte darauf auch sorgfältig Bedacht genommen werden.

Anfänglich meinten wir, daß es genügte, den Dextrinniederschlag abzufiltrieren und zu wägen, nachdem er durch Trocknen im Vakuum vom Pyridin befreit worden war; es zeigte sich jedoch, daß diese Niederschläge noch viel Maltose festhalten, was nicht zu verwundern ist, da es sich hier ausschließlich um eine Ausflockung eines Organokolloids handelt. Es war daher notwendig, das Produkt durch wiederholtes Auflösen und Fällen zu reinigen. Im allgemeinen erwies sich das Reduktionsvermögen des Dextrins nach dreimaliger Wiederausfällung als konstant, so daß wir annehmen durften, daß es maltosefrei war.

Verzuckerung bei 55° C.

Ausgangsstoff: 2 proz. Lintnerstärke.

Malzextrakt bereitet aus Brennereimalz der Niederländischen Hefe- und Spiritusfabrik in Delft.

Verzuckerungsdauer: 24 Stunden.

Reduktionsvermögen der verzuckerten Lösung (ausgedrückt in Prozenten Maltose): 81,9.

Polarisation der verzuckerten Lösung (ausgedrückt in Prozenten Maltose): 103,3.

Abgeschiedene Dextrine:

1. Fällung	R_m = 33,00	
2. ,, ...	R_m = 17,35	
3. ,, ...	R_m = 12,60	Mittelwert 12,9
4. ,, ...	R_m = 13,20	

[1]) *J. Groot*, diese Zeitschr. **146**, 72, 1924.
[2]) Ann. **377**, 220, 1910.

Diese Dextrine gaben bei neuerlicher Bearbeitung keine weitere Abnahme des Reduktionsvermögens, wir betrachteten sie daher als maltosefreie Grenzdextrine.

Verzuckerung bei 45° C.

Ausgangsstoff: 2 proz. Lintnerstärke.
Malzextrakt: Wie oben.
Verzuckerungsdauer: 48 Stunden.

Abgeschiedene Dextrine:

1. Fällung . . . . . $R_m = 31,8$
2. „ . . . . . $R_m = 21,9$
3. „ . . . . . $R_m = 13,7$
4. „ . . . . . $R_m = 13,1$
5. „ . . . . . $R_m = 13,2$

Verzuckerung bei 39° C.

Ausgangsstoff: 2 proz. Lintnerstärke; $p_H = 5,6$ (Phosphatpuffer).
Malzextrakt: Wie oben.

Verzuckerungsdauer in Stunden	R_m in Proz. Maltose ausgedrückt
2¹/₂	75,6
23	80,9
48	84,4
112	83,6

Um aus diesen Daten den wirklichen Maltosegehalt der verzuckerten Flüssigkeit zu finden, mußten wir zur folgenden Berechnung unsere Zuflucht nehmen:

Bezeichnen wir den Prozentgehalt an Maltose, die bei der Reaktion gebildet wird, mit x; dann wird die Menge Dextrine dargestellt durch $100 - x$. Ferner sei das nach Ablauf der Verzuckerung im Reaktionsprodukt bestimmte Reduktionsvermögen R_r, das der abgeschiedenen Dextrine nach oben beschriebener Reinigung R_g; dann dürfen wir annehmen, daß:

$$\frac{x}{100} \cdot 100 + \frac{100 - x}{100} \cdot R_g = R_r,$$

da das Reduktionsvermögen von Maltose 100 ist, oder:

$$x = 100 \cdot \frac{R_r - R_g}{100 - R_g}.$$

Wenden wir diese Formel nun auf obenstehendes Beispiel an, so finden wir:

$$x = 79,3 \text{ Proz.}$$

Die für das den Dextrinen zukommende Reduktionsvermögen anzubringende Korrektur beträgt also 2,6 Proz., es werden in Wirklichkeit anstatt 82 Proz. nur 79 Proz. Maltose gebildet.

Bei einem anderen Versuch wurden die folgenden Werte erhalten:

Verzuckerungstemperatur: 45°.

Verzuckerungsdauer: 48 Stunden.

Ausgangsstoff: 12,5 g lösliche Stärke mit einem Wassergehalt von 17,2 Proz., 10,344 g wasserfreier Substanz entsprechend.

Malzextrakt bereitet durch kalte Extraktion von Malz der Niederländischen Hefe- und Spiritusfabrik, 10 g Malz pro 100 ccm Wasser. Die Stärke wurde zu ½ Liter aufgelöst und in vier Kölbchen je 100 ccm abpipettiert. Zu jedem Kölbchen wurde 1 ccm Malzextrakt hinzugefügt. In jedem Kölbchen Flüssigkeitsvolumen 101 ccm.

Wenn wir annäherungsweise eine Umsetzung bis zu 80 Proz. Maltose annehmen, so kann per Kölbchen entstehen:

$$2{,}069 \cdot \frac{339}{324} = 2{,}167 \text{ g}$$

an Reaktionsprodukt. Gefunden wurde für das Reduktionsvermögen und das Drehungsvermögen nach Korrektur für den hinzugefügten Malzextrakt:

Kölbchen-Nr.	R_m (korrigiert)	r (korrigiert) Ventzke-Skala
1	83,6	+ 18,1
2	84,9	18,2
3	83,6	18,0
4	85,4	18,1

Die dritte Spalte gibt das korrigierte Drehungsvermögen an, gemessen in einer 2 dm langen Röhre und ausgedrückt in Teilen der Ventzke-Skala.

Aus dem Mittelwert dieser Spalte folgt für das $[\alpha]_D^{20}$ des Reaktionsproduktes:

$$\frac{18{,}0 \cdot 0{,}347 \cdot 101}{2 \cdot 2{,}167} = 145{,}6.$$

Für das Reduktionsvermögen und die spezifische Drehung des zweimal aus Pyridin und einmal aus Wasser umgefällten Grenzdextrins wurde gefunden:

$$R_m = 12{,}73$$
$$[\alpha]_D^{20} = 178{,}5.$$

Wenden wir nun obenstehende Formel auf das Reduktionsvermögen an, dann finden wir für den wirklichen Maltosegehalt 82,1 Proz. und für den wirklichen Dextringehalt 17,9 Proz. Wir können nun diese Werte in eine analoge Formel für die Drehung einführen und damit das Drehungsvermögen des Reaktionsproduktes berechnen. Wir finden dann für das spezifische Drehungsvermögen:

$$\frac{82{,}1}{100} \cdot 138{,}1 + \frac{17{,}9}{100} \cdot 178{,}5 = 145{,}3$$

ein Wert, der vollkommen mit der experimentell gefundenen Zahl übereinstimmt.

Diese Berechnung stimmt natürlich nur dann, wenn die Reaktion nach dem Schema:

$$(C_6H_{10}O_5)_x + H_2O \longrightarrow C_{12}H_{22}O_{11} + \text{Grenzdextrin}$$

verläuft. Werden bei dem Prozeß noch andere Zucker, z. B. Glucose, gebildet, so kann man zu unrichtigen Schlußfolgerungen kommen.

Wir haben deshalb das pyridinhaltige Filtrat, das nach der Abscheidung der Dextrine übrigblieb, einer näheren Untersuchung unterworfen.

Aus diesem Filtrat mußten dazu erst das Pyridin und der Alkohol entfernt werden. Dies ist uns nur durch Destillation mit Wasserdampf gelungen, andere von uns versuchte Methoden lieferten keine befriedigenden Ergebnisse. Es ist nicht zu leugnen, daß diese Dampfdestillation im Hinblick auf den schwach alkalischen Charakter des Pyridins Bedenken unterliegt, was auch aus den hier folgenden Zahlen deutlich hervorgeht. Wir führen diese Zahlen gleichwohl an, weil wir meinen, daß infolge der verhältnismäßig sehr niedrigen Pyridinkonzentration der Einfluß nicht so groß ist, daß aus den gefundenen Werten nicht ein Einblick in die Verhältnisse des Filtrats gewonnen werden kann.

Gefunden wurde für das erste Filtrat, d. i. das Filtrat, aus dem die Dextrine mit einer Reduktionszahl 33 abgesondert worden waren:

Volumen 1100 ccm, Drehung = + 4,2 Ventzke-Skala
R_m (per 5 ccm) : 5,0 ccm n/10 $Na_2S_2O_3$;

woraus ein Maltosegehalt folgt:

polarimetrisch: 5820 mg, reduktometrisch: 5940 mg.

Zu erwarten wäre, daß infolge des In-Lösung-Gehens einer Spur von Dextrin der reduktometrisch erhaltene Wert niedriger sein müßte als der auf polarimetrischem Wege gefundene; daß dies nicht der Fall ist, deutet darauf hin, daß das Pyridin die Fraktion nicht unverändert gelassen hat. Die Abweichungen sind aber nicht derart, daß sie durch Beimengung von erheblichen Mengen Glucose verursacht sein können, um so mehr, als die Verminderung der spezifischen Drehung gerade durch das Pyridin sehr begünstigt wird, wie aus untenstehenden Zahlen hervorgeht[1]).

Einfluß von Pyridin auf Maltose.

A. In der Kälte: Aufgelöst etwa 2 g Maltose in 200 ccm Wasser, 5 Proz. Pyridin enthaltend:

Drehung sofort	6,75	Ventzke-Skala
„ nach 1 Tag	6,70	„
„ 2 Tagen	6,70	„

[1]) *J. Groot*, l. c.

B. In der Wärme: Eine gleiche Lösung:

Drehung vor Erwärmung . .	+ 6,7	Ventzke-Skala
„ nach ½ Stunde . .	+ 5,6	„
„ „ 1½ Stunden .	+ 4,8	„

Diese Lösung wurde titriert:

	Wässerige Lösung	Pyridinhaltige Lösung
reduktometrisch .	1784	1758
polarimetrisch . .	1708	1683

Die Abweichung liegt in derselben Richtung wie in unserem Falle. Es zeigte sich ferner, daß die Kristallisierbarkeit in diesen Fällen nicht beeinflußt wird, die vom Pyridin befreiten Filtrate kristallisierten alle sehr leicht.

Wir haben diese Untersuchung mehrmals mit verschiedenen uns von der Niederländischen Hefe- und Spiritusfabrik zur Verfügung gestellten Malzsorten wiederholt und haben bei Anwendung der oben beschriebenen Trennung dabei immer ausgiebige Niederschläge erhalten, die bei weiterer Behandlung auf ein Grenzdextrin mit einem $R_m = 13$ verarbeitet werden konnten.

Wir glauben daher zusammenfassend sagen zu dürfen, daß bei Verwendung dieser Malzsorten neben Maltose eine bestimmte Gruppe von Grenzdextrinen bzw. ein bestimmtes Grenzdextrin gebildet wird, so daß die *Umsetzung in Maltose nicht quantitativ durchzusetzen ist.* Diese Ergebnisse stimmen also mit denen von *Lintner* überein.

Auf die Eigenschaften dieser Grenzdextrine gedenken wir in einer späteren Veröffentlichung zurückzukommen. Vorläufig möchten wir bemerken, daß sie ultrafiltrierbar sind, von Säuren schwer angegriffen werden (schwerer als Maltose) und weder durch Malzextrakt der Niederländischen Hefe- und Spiritusfabrik, noch durch Diastasepräparate von *Merck*, *Kahlbaum* und *Poulenc* zu Maltose abgebaut werden. Auch die nach *Willstätter* aus Hefe bereitete Maltase spaltet diese Dextrine nicht.

3,0952 g Dextrin, aufgelöst zu 100 ccm, $p_H = 6,8$. 25 ccm dieser Lösung + 1 ccm Maltase gaben eine Anfangsdrehung + 25,25 Ventzke-Skala, nach 1 Stunde bei 30° C + 25,30, nach 3 Stunden + 25,25.

Zum Vergleich ließen wir dieselbe Maltase auf eine Maltoselösung einwirken, die 0,784 g Maltose auf 25 ccm und 1 ccm Maltase enthielt. Anfangsdrehung + 24,0, nach 1 Stunde 19,6, nach 3 Stunden 15.

Nach den Untersuchungen von *Pringsheim* kann bei Anwendung besonderer Malzsorten ein beträchtlich höheres Reduktionsvermögen bei der Verzuckerung erhalten werden. Es war daher von Interesse, unsere Methode auch auf die Reaktionsprodukte dieser Verzuckerungen anzuwenden. Wir sprechen hiermit Herrn Prof. *Pringsheim* unseren

Dank für die Zusendung seines Malzes aus, wodurch er es uns ermöglichte, diese Versuche auszuführen.

Es zeigte sich alsbald, daß der Charakter der Verzuckerungen bei Gebrauch dieser Malzsorten ein ganz anderer ist. Es wurden nicht nur beträchtlich höhere Reduktionszahlen gefunden, sondern überdies sehr bedeutend verminderte Dextrinniederschläge erhalten. Auch die Kristallisationsverzögerungen im Reaktionsprodukt traten nicht mehr in dem Maße auf, so daß innerhalb beschränkter Zeit kristallisierte Maltose isoliert werden konnte.

Auch *ohne* das von *Pringsheim* angegebene *Komplement* aus der Hefe zu verwenden, gelang es uns, die Umsetzung bis zu einem $R_m = 96$ durchzuführen und dabei einen kristallisierenden Syrup zu erhalten.

500 ccm einer 2 proz. Lösung von löslicher Stärke wurden mit Malzextrakt „Byk" bei 37° verzuckert. Nach 4 Tagen war die Verzuckerung bis zu einem $R_m = 92{,}3$, nach 7 Tagen bis zu einem $R_m = 94{,}5$ fortgeschritten. An diesem Tage betrug der polarimetrisch bestimmte Maltosegehalt 96,8 Proz., so daß der Dextringehalt nur mehr sehr gering sein konnte. Mit Hilfe der Pyridinmethode wurden 320 mg maltosehaltiges Dextrin abgesondert. Bei der weiteren Reinigung durch wiederholte Präzipitation aus Pyridin wurde so wenig Dextrin erhalten, daß eine Analyse nicht mehr ausführbar war. Bei einem 9 Tage fortgesetzten Versuch wurde mit Leichtigkeit ein $R_m = 95$ erreicht, in einem Falle überschritten wir sogar den Wert von 96 Proz.

Wir dürfen daher mit Sicherheit annehmen, daß bei der diastatischen Verzuckerung unter besonderen Umständen die Maltose aus der Stärke quantitativ gebildet werden kann; dies wird jedoch bei den meisten Malzsorten und allen dialysierten Diastasepräparaten nicht der Fall sein, nur jene Malzsorten, die reichlich Komplement enthalten, werden eine derartige Umsetzung geben können. Wenn die Diastase minder komplementhaltig ist, wird die Reaktion in einem früheren Stadium stehen bleiben, nämlich bei etwa 80 Proz. Maltose und 20 Proz. Dextrin, da die aus dem Amylopektinanteil gebildeten Depolymerisationsprodukte durch komplementarmes Enzym nicht angreifbar sind[1]).

Der auf Seite 236 berichtete Unterschied in der Auffassung der verschiedenen Autoren geht aus den dargelegten Verhältnissen hervor, die Ursache dieser Widersprüche ist hiermit wohl endgültig aufgeklärt.

Das Problem des diastatischen Stärkeabbaues ist damit jedoch noch nicht erledigt. Die Grenzprodukte als solche, die Zwischenstadien der Reaktion und das Verhalten bei höherer Temperatur sind noch ganz ungenügend studiert und es müssen noch die Zusammenhänge zwischen den natürlichen Dextrinen einerseits und den von *Pringsheim*

---

[1]) *Pringsheim* und *Beiser*, diese Zeitschr. **148**, 336, 1924.

und *Pictet* studierten synthetischen Dextrinen andererseits aufgedeckt werden (Amylosenserie von *Schardinger*, Tri- und Dihexosan von *Pictet*).

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß sich unsere die Grenzdextrine betreffenden Resultate noch nicht völlig an den von *Pringsheim* für dieses Dextrin angenommenen Trihexosantypus anschließen. Trihexosan reduziert nämlich nicht, wie wir uns selbst durch dessen Darstellung noch einmal überzeugt haben. So lange *Pringsheim* seinen Grenzdextrinen noch ein eigenes Reduktionsvermögen zuerkennt (in seiner letzten Abhandlung gibt er an $R_m = 7{,}5$) und wir ebenfalls noch erheblich reduzierende Grenzdextrine finden, können wir den Zusammenhang mit dem Trihexosan noch nicht genügend scharf erkennen.

Den Zusammenhang zwischen diesen Gruppen zu finden und die *Irvine*schen Methylierungsmethoden auf die natürlichen Dextrine anzuwenden, muß die Aufgabe der weiteren Untersuchung der diastatischen Abbaureaktion bilden.

Herrn Prof. Dr. *H. I. Waterman*, in dessen Laboratorium diese Untersuchungen ausgeführt wurden und der uns mit Rat und Tat zur Seite stand, sprechen wir hiermit unseren Dank aus.

Über den Einfluß von Lecithin, Cholesterin und Cholesterinderivaten auf die tryptische Verdauung.

Von

Fr. Standenath.

(Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie in Graz.)

(Eingegangen am 27. Dezember 1924.)

Untersuchungen der letzten Zeit[1]) beschäftigten sich mit dem Einfluß von Lecithin und Cholesterin auf die Trypsinwirkung gegenüber Casein. Bisher unveröffentlichte Versuchsergebnisse, zu denen ich vor 2 Jahren im Rahmen einer größeren Arbeit[2]) gekommen war, bestätigen und erweitern in gewisser Hinsicht die Befunde *Hagiharas*. Ich bringe sie deshalb auszugsweise zur Kenntnis.

Die Versuche sind angestellt mit der Verdauungsreaktion nach *O. Gross*, die nach einer schriftlichen Mitteilung dieses Autors gemeinhin fälschlich als *Fuld-Gross*-Methode bezeichnet wird, und zwar in jener Ausführung, wie sie sich *H. Pfeiffer* und *Jarisch* bei der Antitrypsinbestimmung im Serum bewährt hat[3]). Zur Verwendung kam reinstes Casein *Hammarsten* und Trypsin *Merck*, das im System genau auf 0,3 eingestellt war, bei einer Temperatur von 37° und einer Verdauungszeit von einer halben Stunde.

Untersucht wurden die Lecithinpräparate *Lecithol* und *Lecithin* (*Merck*).

Da diese mit physiologischer Kochsalzlösung trotz langsamer und sorgfältiger Verreibung in einer Achatschale nur eine relativ grobe Emulsion geben und somit beim Zusetzen zum System keine gleichmäßige Verteilung gewährleistet wird, wurden sie außerdem in Methylalkohol gelöst (0,5 Lecithin in 10 ccm Alkohol ergibt eine klare, gelblich gefärbte Flüssigkeit). Von der Kochsalzemulsion bzw. von der alkoholischen

---

[1]) Z. B. *Jitsuichi Hagihara*, diese Zeitschr. **144**, 482, 1924.

[2]) *H. Pfeiffer* und *Fr. Standenath*, Zur Kenntnis des Trypsins und seines natürlichen Hemmungskörpers im Serum. Fermentforschung **7**, H. 1, S. 14.

[3]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **16**, 66, 1913.

Lösung wurden je 0,2 ccm dem System zugesetzt; die dabei auftretenden Trübungen müssen in den einzelnen Phasen des Versuches stets mit jenen der Kontrollreihen (Systemkontrollen ohne Trypsin und Kochsalzkontrollen) verglichen werden. Die endgültige Ablesung nach Zutropfen von Essigsäurealkohol kann infolge der Trübungen nur an der Ringbildung und den relativen Trübungsstärken erfolgen.

Resultat wiederholter Prüfungen: Nach einer halben Stunde 37° Brutschrank System 0,3 ccm; System + Methylalkohol allein 0,3 ccm; System + NaCl-Lecithinemulsion Ringbildung bis 1,2 ccm; System + NaCl-Lecithinemulsion oberer Anteil nach Absetzenlassen, infolge des geringeren Lecithingehaltes Ringbildung bis 0,6 ccm; System + Lecithin (bzw. Lecithol), gelöst in Methylalkohol, Ringbildung bis 1,2 ccm.

Es fand sich also eine starke Hemmung der tryptischen Verdauung.

Reihenversuche mit *Cholesterin*. Dieses wurde, da es in Methylalkohol sehr schwer löslich ist, in Aceton gelöst (0,1 Cholesterin auf 6 ccm Aceton); davon je drei Tropfen zum System.

Ergebnis: Nach einer halben Stunde 37° System 0,3 ccm; System + Aceton 0,3; System + Cholesterinacetonlösung 0,3 ccm. Ringbildung nur im ersten und zweiten Röhrchen, ebenso relativ stärkere Trübung und Ausflockung des Caseins nach mehreren Stunden bei Zimmertemperatur. Also keine Hemmung der Trypsinverdauung durch Cholesterin.

Von Cholesterinestern und anderen Cholesterinderivaten wurden in gleicher Weise untersucht: Cholesterylpropionat und -oleat; Cholesterylbromid und -dibromid; Cholesterylchlorid und -dichlorid; Cholesterylacetat, Nitrocholesterylacetat und Cholesteryläther (gelöst in Aceton, da sehr schwer oder nicht löslich in Methylalkohol); außerdem Cholsäure (gelöst in Methylalkohol). Die Präparate stammen von *H. Fischer*, München und weiland *J. Mauthner*, Wien.

Resultat: Nach einer halben Stunde 37° System 0,3 ccm; System + Methylalkohol 0,3, System + Aceton 0,3 ccm, System + Acetonlösung sämtlicher Ester und Derivate 0,2 oder 0,3 ccm, also wiederum keine Hemmung der Trypsinwirkung. Nur Cholsäure (gelöst in Methylalkohol) wegen der sauren Reaktion 0,8 ccm.

Zusammenfassung.

Lecithin hemmt stark die tryptische Verdauung im Groß-Versuch; Cholesterin und Cholesterinderivate haben keinen Einfluß auf diese.

Über den Ammoniakgehalt und über die Ammoniakbildung im Blute. II[1]).

Von

J. K. Parnas.

[Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Lwów (Lemberg).]

(Eingegangen am 28. Dezember 1924.)

(Mit 2 Abbildungen im Text.)

I.

In der ersten Mitteilung haben wir eine neue Methode der Ammoniakbestimmung im Blute beschrieben und mit Hilfe dieser Methode den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im *Kaninchenblut* studiert. Um ein möglichst eindeutiges Bild der Vorgänge und ihrer Bedingungen zu erhalten, haben wir uns ausschließlich auf Untersuchung einer Tierart beschränkt, und wir haben es auch dementsprechend vermieden, unsere Ergebnisse zu denen anderer Forscher in Gegensatz zu bringen, die an anderen Tierarten, mit anderen Methoden arbeitend, zu anderen Ergebnissen gelangt sind. Unter solchen Verschiedenheiten der Ergebnisse sei besonders hervorgehoben, daß *Nash* und *Benedict*[2]) am *Hundeblut* sowie am *Rinderblut* keine nennenswerte Ammoniakbildung beobachten konnten, die in unseren Versuchen am Kaninchenblut so deutlich hervortritt[3]). Bevor Versuche zur Erforschung der Herkunft des Blutammoniaks und der Art der ammoniakgebenden Substanz sowie zur Lokalisierung der betreffenden Vorgänge durchgeführt werden, mußten die Widersprüche zwischen unseren Ergebnissen und den methodisch zuverlässigen Resultaten anderer Forscher aufgeklärt werden. Ich habe das Blutammoniak bei anderen Tierarten untersucht und teile die Ergebnisse dieser Untersuchung, die recht überraschend waren, auch aus diesem Grunde mit, weil die am Kaninchenblut gefundenen Verhältnisse leicht verallgemeinert werden und zu falschen Ansichten führen könnten.

---

[1]) *J. K. Parnas* und *J. Heller*, diese Zeitschr. **152**, 1, 1924.
[2]) Journ. of biol. Chem. **58**, 463, 1921.
[3]) Diese Zeitschr. **152**, 15 (Fußnote), 1924.

Ich fand bei allen untersuchten Tierarten präformiertes Ammoniak und Ammoniakbildung im Blut; in quantitativer Beziehung jedoch sehr große Unterschiede. Es wurde das Blut von Kaninchen, Hammel, Hund, Rind, Schwein, Huhn, Ente, Taube, Pferd sowie Menschenblut analysiert. Ein Blick auf die Kurvenbilder (Abb. 1) zeigt, wie groß die Unterschiede sind. Man vergleiche etwa das Pferdeblut mit

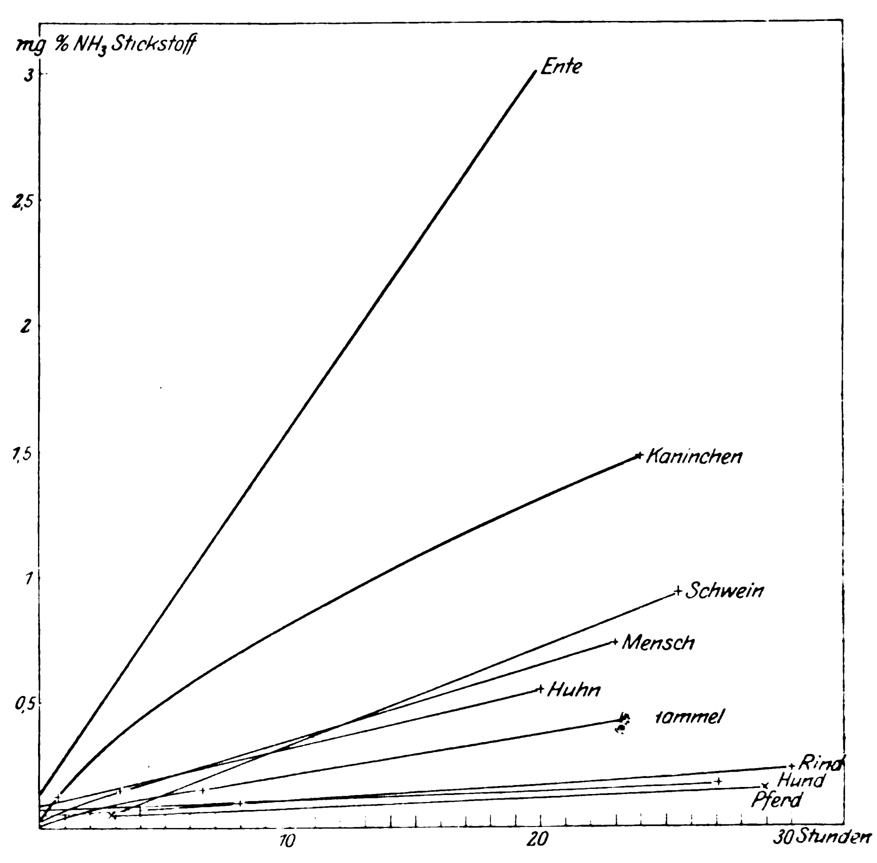


Abb. 1. Ordinaten: Ammoniakgehalt in 100 ccm Blut. Abszissen: Zeit von der Blutentnahme an gerechnet. Temperatur: 17°.

seiner kaum 0,2 mg-Proz. erreichenden Ammoniakbildung mit dem Entenblut, in welchem der Ammoniakgehalt in 24 Stunden auf 3 mg-Proz. hinaufgeht. Auch bezüglich des Anfangswertes zeigt der Ammoniakgehalt verschiedener Tierarten große Verschiedenheiten. Versuche am Kaninchen, Menschen, Hund und Hammel, Huhn und Ente sind in dieser Beziehung vergleichbar, in allen wurde das Blut aus großen

Venen entnommen und in 1 bis 2 Minuten der Destillation unterworfen. Es wurde gefunden:

Kaninchen mg-Proz.	Hund mg-Proz.	Hammel mg-Proz.	Mensch mg-Proz.	Huhn mg-Proz.	Ente mg-Proz.	Taube mg-Proz.
0,025	0,075	0,01	0,03	0,082	0,13	0,1

Für das Pferdeblut und Rinderblut mit ihrer sehr trägen Ammoniakbildung ergibt sich, ähnlich wie für Hundeblut, durch Extrapolation ein hoher Anfangswert von 0,05 bis 0,07 mg-Proz., während das Schweineblut, ähnlich wie Kaninchenblut und Hammelblut mit ihrer lebhafteren Ammoniakbildung geringere Anfangswerte (d. h. Ammoniakkonzentrationen im kreisenden Blut) aufweist.

Es soll auch noch die Frage der Beziehungen der Ammoniakbildung zum Bluthamstoff in dieser Arbeit berührt werden. Wir haben festgestellt, daß die Menge des nichtkolloiden Stickstoffs sowie des Harnstoffs (mittels Urease bestimmt) infolge der Ammoniakbildung im Blut keine Änderung erfährt. Diese Behauptung wird hier noch durch Harnstoffbestimmungen auf gravimetrischem Wege gestützt. Die Versuche fallen besonders klar aus am Vogelblut, wo z. B. bei der Ente der geringe Gehalt von 4,8 mg-Proz. Harnstoffstickstoff unverändert bleibt, während der Ammoniakstickstoffgehalt von 0,1 auf 3 mg-Proz. anwächst, oder wo im Hühnerblut überhaupt kein Harnstoff durch Xanthydrol fällbar ist. Überhaupt ist Harnstoff in Blut völlig stabil, und ich habe in keiner Blutart eine Andeutung von Ureasewirkung beobachten können.

II.

Die früher angewandte Methode wurde mit geringen Abänderungen beibehalten.

Die Alkalisierung des Blutes wird jetzt mittels einer stärkeren Boratlösung vorgenommen. Diese Lösung erhält man durch Auflösen von 12,4 Borsäure („für Enzymstudien nach *Sörensen*", *Kahlbaum*) in 110 ccm n NaOH; es kristallisiert Borat aus und die überstehende gesättigte Lösung hat eine $h = 10^{-9,3}$. 1 ccm der Lösung erteilt 2 ccm Blut diejenige Reaktion, welche sowohl für die Hemmung der Ammoniakbildung, als für die Austreibung des Ammoniaks als besonders vorteilhaft gefunden wurde, d. h. $h = 10^{-9,2}$. Bei ihrer Verwendung fallen die Kontrollen (3)[1] ganz blank aus.

Da ich mich wiederholt davon überzeugt habe, welche Fehlerquelle die Schwefelabgabe (besonders aus neuen Gummistücken) bedeutet, habe ich noch eine locker gewickelte Silbernetzspirale (5 cm Länge) in die Verjüngung zwischen *S* und *N* (I. Mitt., Abb. 1, S. 6, Bd. 152 dieser Zeitschr.) eingeschaltet.

[1]) *Parnas* und *Heller*, l. c., S. 10.

Ich unterwerfe in der Regel 2 ccm Blut der Destillation. Die kolorimetrische Bestimmung des geringen Ammoniakgehaltes im frischen Blute wird jetzt auch mittels des *Wolff*schen Kolorimeters ausgeführt; ich verwende Mensuren von 7,5 mm lichter Weite, die, wenn sie hoch aufgefüllt sind, auch ohne Schwimmer[1]) gleichmäßige Gesichtsfelder ergeben. Es wird also so verfahren, daß die letzte Kontrolle (1) vor der Blutdestillation aufbewahrt wird; dann, nachdem schon das Blutdestillat mit dem Nesslerreagens versetzt worden ist, wird aus der Bürette die Standard-Ammonsulfatlösung so weit zur aufbewahrten Kontrolle (1) zugesetzt, bis ihr Farbton dem des Destillats entspricht. Dann wird erst der Vergleich im Kolorimeter durchgeführt. Wenn zur Kontrolle (1) n ccm einer Standardlösung hinzugefügt werden mußten, die 0,002 mg Ammoniakstickstoff im Kubikzentimeter enthält, um Farbengleichheit mit dem Destillat aus 2 ccm Blut zu erzielen, so enthält das Blut $n/10$ mg Ammoniakstickstoff in 100 ccm; ist Farbgleichheit erzielt worden, wenn diese Standardlösung auf $m/100$ abgelassen worden ist, so enthält das Blut $m \cdot n/1000$ mg in 100 ccm.

Als Standardlösung für den kolorimetrischen Vergleich verwende ich eine Ammonsulfatlösung, welche durch Zusatz von einer sehr kleinen Menge $HgCl_2$[2]) konserviert wird. Man vermeidet so die Störungen durch den trübenden Toluolzusatz. Es werden Standardlösungen mit 0,01 und mit 0,002 mg NH_3-Stickstoff im Kubikzentimeter verwendet. Daneben werden für die Kontrollen (4) ebensolche Lösungen mit Toluolzusatz ohne Quecksilbersalz bereitgehalten, da aus quecksilberhaltigen Lösungen das Ammoniak bei Destillation nicht vollständig entweicht.

In der gegenwärtigen Gestalt der Methode, d. h. bei Anwendung von 2 ccm Blut, der gesättigten Boratlösung, weiterer Sicherung durch Silberspiralen und kolorimetrischem Vergleich ungetrübter Flüssigkeiten, erlangt man einen hohen Grad von Sicherheit in der Abschätzung der zweiten Dezimale der Milligramme pro 100 ccm Blut. Man erhält auch nunmehr ganz verschiedene Werte für den Ammoniakgehalt des frischen (1 bis 2 Minuten nach der Entnahme) Jugularisblutes verschiedener Tierarten, was noch vor kurzer Zeit außerhalb der Möglichkeiten der vorhandenen analytischen Methoden erschien.

Was die Reinigung des Apparates betrifft, so habe ich auf die automatische Entleerung und Reinigung des Destillierkolbens verzichtet, die bei seiner Verwendung für die Destillation nach *Kjeldahl* bequem ist; er wird nach beendeten Destillationen von Kühler, Trichter und Hahn gelöst, die Silberspiralen herausgenommen und der Inhalt mit Leitungswasser ausgespült; dies nimmt nur wenige Minuten in Anspruch.

In allen hier mitgeteilten Versuchen wurde das Blut — sofern nicht anderes bemerkt — im Wasserbade von 17° gehalten.

Da bei dieser Temperatur die Ammoniakbildung langsam und über viele Stunden ganz gleichmäßig verläuft, so ist auch in Fällen, wo man das Blut von großen Schlachttieren nicht sofort verarbeiten kann, die Extrapolation des Anfangswertes möglich, wenn man nur den Moment der Blutentnahme kennt.

---

[1]) *G. u. H. Kruess*, Kolorimetrie. 2. Aufl., S. 13.

[2]) 0,15 g $HgCl_2$ in 1 Liter der stärkeren, 0,03 g $HgCl_2$ in 1 Liter der schwächeren Standardlösung.

Den Wert der in der vorhergehenden Mitteilung angegebenen Kontrollproben[1]) konnte ich im Verlauf dieser Arbeit voll einschätzen lernen. Sie ließen keinen Zweifel darüber, daß die so sehr abweichenden Befunde an verschiedenen Blutarten reelle Bedeutung haben.

Einige Versuche haben sich bis auf 170 Stunden erstreckt. Der Verlauf des Ammoniakgehaltes zeigt in diesen Versuchen aufs deutlichste, daß weder äußere Ammoniakzufuhr, noch bakterielle Zersetzungen von Eiweißkörpern, Harnstoff und dergleichen bei der Ammoniakbildung im Blute mitwirkt. Der maximale Ammoniakgehalt bleibt tagelang konstant.

In einigen Versuchen sind die Werte des maximalen Ammoniakgehaltes, da die Ammoniakbildung sehr langsam verläuft, in der Weise ermittelt worden, daß das Blut bei 40° gehalten wurde. Man erreicht dann in wenigen Stunden den Ammoniakgehalt, der sich bei 17° erst in Tagen entwickelt.

Die Harnstoffbestimmung nach *Fosse*[2]), die an Eleganz und Exaktheit unter den biochemischen Methoden kaum ihresgleichen hat, ist bekanntlich von *M. Nicloux* und *G. Welter*[3]) für kleine Blutmengen — unter Anwendung der mikrochemischen Wage — ausgearbeitet worden. Ich folgte im wesentlichen der Methode von *Nicloux* und *Welter* und konnte mich davon überzeugen, daß das von *Fosse* und diesen Autoren für die Enteiweißung angewandte Reagens nach *Tanret* besonders geeignet ist; es erwies sich nicht möglich, die Bestimmung als Xanthylharnstoff mit der Enteiweißung durch Wolframsäure nach *Folin* und *Wu* zu kombinieren. Ich verdünne aber nicht so stark wie *Nicloux* und *Welter*.

2 ccm Blut werden durch 6 ccm Wasser, das mit Xanthylharnstoff gesättigt ist, hämolysiert, 2 ccm *Tanret*sches Reagens hinzugefügt, nach einigen Minuten filtriert; vom Filtrat werden 4 ccm pipettiert, mit 4 ccm mit Xanthylharnstoff gesättigtem Eisessig versetzt und 0,4 ccm 5proz. Xanthydrol[4]) in Methylalkohol versetzt. Nach 1 Stunde wird der kristallisierte Niederschlag filtriert, mit Methylalkohol und Wasser (beide mit Xanthylharnstoff gesättigt) gewaschen (zum Schluß mit wenigen Tropfen reinen Methylalkohols), im geheizten Vakuumexsikkator bei 100° getrocknet und gewogen.

Für die Filtration und Wägung hat sich mir ein neues Filtriergerät sehr gut bewährt, welches Schott u. Gen, Jena, auf meinen Vorschlag entgegenkommend angefertigt haben[5]). Es ist ein sehr leichter, kleiner Tiegel mit dünner, dichter Filterplatte aus gesintertem Glas, der in besonderer Weise beim Filtrieren montiert wird. Die Goochtiegel nach Schott u. Gen. haben einen unter der Filterplatte vorstehenden Rand; man kann sie sehr bequem verwenden, wenn man diesen Rand eben und glatt abschleift und sie dann einfach auf den Stopfen der Saugflasche stellt, durch dessen Öffnung man ein Stück Glasrohr durchführt. Sie saugen sich dann an dem Stopfen fest und man braucht weder Vorstoß noch Gummimanschette.

---

[1]) Diese Zeitschr. **152**, 10, 1924.

[2]) *Fosse, Robyn, Francois*, C. r. **159**, 367, 1914.

[3]) Ebendaselbst **173**, 1490, 1921.

[4]) Siehe die ausgezeichnete Vorschrift für die Darstellung. *Werner*, Chemistry of Urea, S. 183. London 1923.

[5]) Unter der Bezeichnung 63 a. G. 1/< 7.

In der gleichen Weise kann man die neuen Filtertiegel verwenden, die in halber Größe hier abgebildet sind. Sie wiegen 4 g und sind so wenig hygroskopisch, daß ihr Gewicht, wenn sie aus dem Exsikkator herausgenommen werden, in 1 Stunde weniger als $^{1}/_{100}$ mg zunimmt. Wenn hygroskopische Substanzen gewogen werden sollen, so werden die Tiegel in Wägegläschen gewogen, welche Schott u. Gen. in passender Größe anfertigen; Tiegel mit Wägeglas wiegt etwa 10 g. Man schleift den Tiegel an seinem unteren Rande auf Schmirgelpapier so ab, daß er höchstens 1 mg über eine ganze Zahl von Zentigrammen wiegt, und hat dann Spielraum für Differenzwägungen mit dem Reiter. Das Arbeiten gestaltet sich sehr sauber und bequem. Der Tiegel wird auf den Stopfen der Absaugflasche gestellt, die zu filtrierende Flüssigkeit eingefüllt, dann der Hahn zum Vakuum geöffnet; die Filtration erfolgt auf der großen Platte sehr schnell; dann wird gewaschen und zuletzt der Tiegel einfach abgehoben und in den Exsikkator oder Trockenschrank gestellt. Es können mehrere Filtrationen von Xanthylharnstoff ohne Entfernung der vorherigen Portionen vorgenommen werden; nähert sich das Gewicht des Niederschlages auf dem Filter 1 cg, so daß man nicht mehr mit der Wägung mittels Reiters auskommen würde, so wird der Tiegel durch Aufgießen von Chromsäure-Schwefelsäure über Nacht gereinigt, dann mit Wasser gewaschen, getrocknet und ist wieder verwendungsfähig.

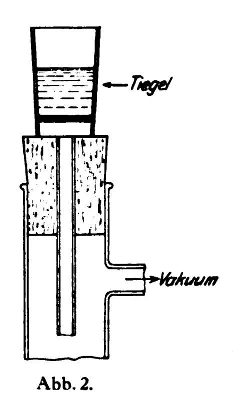


Abb. 2.

Es wurden folgende Werte in 100 ccm frischen Blutes gefunden:

	Kaninchen	Pferd	Huhn	Ente
Harnstoff-N	21,4	30,06	0	5,5, 5,5
Nach 24 Stunden Harnstoff-N . . .	21,1, 21,75	30,08	0	5,2, 4,9
mg Ammoniak-N . .	1,47	0,2	0,6	3,2

III.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle I sowie in den Kurven (Abb. 1) zusammengestellt.

Blutproben von Kaninchen, Hahn, Ente, Hammel wurden von gesunden, gefütterten, ausgewachsenen Tieren aus der Vena jugularis ext. entnommen und sofort verarbeitet. Das Hundeblut war Carotisblut von einem aus schwacher Äthernarkose erwachten Tier. Das Schweine-, Rinder- und Pferdeblut wurde vom Schlachthaus geholt; es war Herzblut bzw. Aortablut von betäubten gesunden Tieren. Das Menschenblut war aus der Vena cubitalis eines 30jährigen gesunden Mannes durch die Nadel entnommen.

Es sei nebenbei bemerkt, daß das Hammelblut bei der Destillation in lästiger Weise schäumt und daß die Ammoniakbestimmung in dieser Blutart Aufmerksamkeit und Geduld erfordert. Auch Rinderblut schäumt, doch stört diese Eigenschaft viel weniger.

Tabelle I.

Zeit seit der Blutentnahme Minuten	mg Ammoniakstickstoff in 100 ccm Blut								
	Kaninchen	Pferd	Huhn	Mensch	Schaf	Schwein	Rind	Hund	Ente
1	0,03	—	—	0,03	0,01	—	—	—	—
2	—	—	0,082	—	—	—	—	—	0,13
3	—	—	—	—	—	—	—	a) 0,075 b) 0,090	—
45	0,125	—	—	—	—	—	—	—	—
60	—	0,15 *)	—	—	—	—	—	—	—
90	—	—	0,125	—	—	—	—	—	—
165	—	0,05	—	—	—	—	—	a) 0,090	—
200	—	—	—	0,15	—	0,072 **)	—	—	—
240	—	—	—	—	—	—	0,07	—	—
390	—	—	—	—	0,15	—	—	—	—
480	—	—	—	—	—	—	0,098	—	—
1200	—	—	0,544	—	—	—	—	—	a) 3,02 b) 3,38
1320	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1380	—	—	—	0,74-	—	—	—	—	—
1440	1,475	—	—	—	0,44	—	—	—	—
1530	—	—	—	—	—	0,94	—	—	a) 3,16
1620	—	—	—	—	—	—	—	0,18	—
1800	—	—	—	—	—	—	0,24	—	—
2940	—	—	—	1,26	—	—	—	—	—
4200	—	—	—	1,36	—	—	—	—	—
4300	—	—	1,3	—	—	—	0,50	—	—
4700	—	—	—	—	—	1,6	—	—	—
4800	—	0,207	—	—	—	—	—	—	—
5200	—	—	—	—	—	1,6	—	—	—
5800	—	—	—	—	1,25	—	—	0,71	—
10000	—	—	—	—	1,26	—	—	—	—

*) Es ist in diesem Falle nicht sicher, ob der höhere Anfangsgehalt nicht durch Verunreinigung durch die Schlachthausluft bedingt ist. — **) Bis dahin bei 0° C gehalten.

Die Versuche, welche sich auf die Ammoniakbildung bei höherer Temperatur beziehen, sind in Tabelle II enthalten.

Tabelle II.

Zeit seit der Blutentnahme Minuten	Temperatur °C	mg Ammoniakstickstoff in 100 ccm Blut					
		Kaninchen	Pferd	Huhn	Schwein	Hund	Ente
120	40	—	—	1,2	—	—	—
240	40	—	—	1,53	—	—	—
270	40	—	—	—	1,28	—	—
360	40	—	0,126	1,53	—	—	—
1000	40	—	—	1,68	—	0,71	—
1200	40	1,9	—	—	—	—	3,35

IV.

Zu den mitgeteilten Zahlen ist, bei dem Stand unserer Kenntnisse in dieser Frage, vorläufig nicht viel zu bemerken. Besonders gern stelle

ich fest, daß ein Widerspruch zwischen den Beobachtungen von *Nash* und *Benedict*[1]) und den hier mitgeteilten Zahlen nicht besteht. Dagegen muß ich die versöhnliche Stellungnahme[2]) gegenüber denjenigen früheren Untersuchungen, in welchen hohe Ammoniakwerte gefunden wurden, teilweise zurücknehmen. Wir glaubten nach den Erfahrungen am Kaninchenblut, daß in jenen Arbeiten die endogene Ammoniakbildung im Blute die einzige Fehlerquelle war; nachdem sich herausgestellt hat, daß die meisten Tiere eine viel schwächere Ammoniakbildung im Blute haben, als das Kaninchen, muß ich, mit *O. Folin*[3]), an eine Verschleppung des Ammoniaks mit den angewandten Reagenzien glauben[4]).

Während der Drucklegung der ersten Mitteilung ist eine Abhandlung von *Henriques* und *Gottlieb*[5]) erschienen, die der Blutammoniakfrage gewidmet ist. Die Autoren gelangen auf Grund neuer, nach dem Durchlüftungsverfahren durchgeführter Versuche zu dem Schluß, daß im Venenblut von Hunden und Ziegen wahrscheinlich überhaupt kein Ammoniak enthalten ist. Ich kann diesem Schluß nicht beipflichten; ich bin vielmehr der Ansicht, daß zwar nach der Tierart sehr variable, aber für jede Tierart und den Ernährungszustand des Individuums bestimmte Ammoniakmengen im Blut enthalten sind; noch charakteristischer als der aktuelle Ammoniakgehalt scheint jedoch der Gehalt an der ammoniakbildenden Substanz zu sein, der jedoch erst durch weitere Untersuchungen kennenzulernen sein wird.

V. Zusammenfassung.

Anschließend an die erste Mitteilung werden weitere Angaben über die Methode der Ammoniakbestimmung im Blute mitgeteilt; es werden ferner über Harnstoffbestimmungen im Blute nach dem Verfahren von *Fosse*, *Nicloux*, *Welter*, sowie die Verwendung eines neuen Filtriergeräts, Erfahrungen angegeben.

Es wird der Ammoniakgehalt sowie die Ammoniakbildung im Blute verschiedener Tierarten (Pferd, Rind, Schwein, Hund, Huhn, Ente, Hammel, Mensch) untersucht.

Es wird ein sehr verschiedenartiges Verhalten der verschiedenen Blutarten in bezug auf Ammoniakgehalt und Ammoniakbildung beschrieben. Der Ammoniakgehalt im Blute von Huhn, Ente, Taube

---

1) Journ. of biol. Chem. **48**, 463, 1921.

2) Diese Zeitschrift **152**, 25, 1924.

3) Physiol. Rev. **2**, 467, 1922.

4) Vor allem scheinen mir die so wohlüberlegten und mühevollen Untersuchungen am Hundeblut von *Medwedew* (Zeitschr. f. physiol. Chem. **72**, 410, 1911) durch solche Fehlerquellen jedes reellen Wertes beraubt.

5) Zeitschr. f. physiol. Chem. **138**, 255, 1924.

ist etwa zehnmal höher als im Hammelblut. Der Wert, welchen der Ammoniakgehalt nach Zersetzung der ammoniakbildenden Substanz im Kaninchenblut erreicht, ist neunmal, im Entenblut 15mal höher als im Pferdeblut.

Es wird durch gravimetrische Harnstoffbestimmungen (besonders am Vogelblut) dargetan, daß die beobachtete Ammoniakbildung keiner Harnstoffzersetzung entspricht.

Weitere Untersuchungen über die Pharmakologie der Gallensekretion.

Von

Emil Stransky.

(Aus dem pharmakologisch-pharmakognostischen Institut der deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 29. Dezember 1924.)

I.

Daß und warum die reichhaltige ältere Literatur über die Pharmakologie der Gallensekretion keine brauchbaren Ergebnisse geliefert hat, habe ich in einer vorangehenden Studie über die Wirkung von Salzen auf die Gallensekretion[1]) einleitend dargelegt. Eine eingehende Besprechung dieser älteren Arbeiten[2]) kann daher füglich unterbleiben, und es wird genügen, das Einschlägige bei den Berichten über die von mir selbst beobachteten Wirkungen von Substanzen anzuführen.

Der Gegenstand ist aber neuerdings wieder von mehreren Autoren behandelt worden, so von *Rost*, *Okada*, *E. Neubauer*, *Pohl*, *Alpern*, *Adachi*, *Specht*, *Brugsch* und *Horsters*, *Petroff*[3]). Wie die ältere Literatur, zeigen aber auch die Berichte über diese neueren Arbeiten weitgehende Widersprüche untereinander hinsichtlich vieler beobachteter Substanzwirkungen. Man kann zwei Gruppen innerhalb der neueren Literatur unterscheiden, wobei die Fehlerquelle der älteren Versuche, welche in der Anwesenheit der Gallenblase gelegen war, durchgehends vermieden erscheint. Die größere Gruppe der Autoren

---

[1]) *Stransky*, diese Zeitschr. **143**, 438, 1923.

[2]) Siehe besonders bei *Winogradow*, Engelmanns Arch. f. Physiol. 1908, S. 313.

[3]) *Rost*, Mitt. a. d. Grenzgeb. **26**, 710, 1913; *Okada*, Journ. of Phys. **49**, 457, 1914; *E. Neubauer*, diese Zeitschr. **109**, 82, 1920; **130**, **556**, 1922; **146**, 480, 1924; Kliwo **3**, 883, 1924; *Pohl*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **30**, 423, 1922; *Alpern*, diese Zeitschr. **137**, 507, 1923; *Adachi*, ebendaselbst **140**, 185, 1923; *Specht*, Bruns Beitr. **128**, 249, 1923; **129**, 483, 1923; *Brugsch* und *Horsters*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **38**, 367, 1923; **43**, 517, 1924; Kliwo **2**, 1538, 1923; Med. Klin. 1924, S. 661; *Petroff*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **43**, 284, 1924.

bediente sich der alten, sozusagen klassischen Methode der permanenten Gallenfistel beim Hunde, nur wenige Autoren (*Neubauer*, *Pohl*, *Petroff* und ich) arbeiteten an den zuerst von *Bürker*[1]) als für Gallenversuche besonders geeignet befundenen Kaninchen im akuten Versuch. Was ich in der ersten Mitteilung (l. c.) zur Frage der Methodik ausgeführt habe, gilt naturgemäß auch für die neueren Arbeiten. Soweit sie mit permanenten Fisteln ausgeführt sind, unterliegen sie der gleichen Kritik wie die älteren Arbeiten, und ihre Ergebnisse lassen sich mit denen der zweiten Gruppe — akute Fistel an Kaninchen — nicht direkt vergleichen, wobei jedoch die Verschiedenheit der *Tierart* meiner Ansicht nach kaum als prinzipiell bedeutungsvoll in Frage kommt[2]). Wie sehr das, was der älteren Literatur mit Ausnahme der Arbeiten von *Rutherford*[3]) (akute Choledochusfistel bei abgebundener Gallenblase beim Hunde) vorgeworfen wurde, auch für die neuere Literatur gilt, geht wohl am besten aus der Diskrepanz der Ergebnisse verschiedener Autoren mit den gleichen Substanzen bei der gleichen Methodik hervor. So fanden z. B. *Brugsch* und *Horsters* das Natriumsalz der Desoxycholsäure als stark galletreibend, *Specht* sah keine Wirkung. *Brugsch* sah Abnahme der Gallensekretion nach Novasurol, *Specht* sah keine Wirkung. *Specht* fand das Natrium salicylicum wirkungslos, erst bei großen toxischen Dosen eine Vermehrung des Gallenflusses, *Brugsch* fand eine Abnahme der Sekretion. *Rost* konnte im Gegensatz zu neuerdings von *Okada* und *Bickel* gewonnenen Ergebnissen weder von Salzsäure, noch von Wittepepton eine sichere Anregung der Gallensekretion feststellen. Damit ist die Zahl der aufgefundenen Widersprüche aber nichts weniger als erschöpft. Während derart die Meinung über die Wirkung der meisten Pharmaka geteilt ist, herrscht nur darüber Einigkeit, daß 1. die Gallensekretion weitgehend von Nerveneinflüssen unabhängig ist, 2. die Galle und die gallensauren Salze sowie ihre Derivate einen Gallenfluß erzeugen und 3. daß den Sekretinen eine fördernde Wirkung zukommt.

Versucht man, aus dem eingehenden Studium der veröffentlichten Versuchsprotokolle eine Ursache für die vielfachen Wider-

[1]) *Bürker*, Pflügers Arch. f. Physiol. **83**, 241, 1901.

[2]) Daß in der Tat nicht Unterschiede der Tierart für den verschiedenen Ausfall des Experiments in Frage kommen, geht überzeugend daraus hervor, daß ich alle von *Rutherford* am Hunde beobachteten Wirkungen auch am Kaninchen feststellen konnte, daß also nicht nur hinsichtlich der Gallen- und Sekretinwirkung Übereinstimmung von Hund und Kaninchen besteht. Diese Feststellung erscheint bedeutungsvoll für die Übertragung der am Tiere gewonnenen Befunde auf den Menschen.

[3]) *Rutherford* und *Vignal*, Humphreys Journ. of anatomy and phys. **10**, 253, 1876; **11**, 61, 625, 1877; *Rutherford*, *Vignal* und *Doods*, Trans. Roy. Soc. Edin. **29**, 133, 1880.

sprüche zu finden, so kann man feststellen, daß diese ausschließlich in jenen Versuchen zutage treten, welche unter Anwendung der permanenten Fistel beim Hunde angestellt worden sind, während die mittels der Methode der akuten Choledochusfistel gewonnenen, einerlei, ob am Hunde (*Rutherford*) oder an Kaninchen, so gut wie keine Widersprüche ergeben haben und das gelegentliche Vermissen einer schwachen Wirkung durch einen anderen Autor ungezwungen daraus zu erklären ist, daß verschieden lange Beobachtungsperioden oder verschiedene Dosen gewählt worden sind. Die Auffassung, daß die Methode der permanenten Gallenfistel ungeeignet ist, findet ihre Bestätigung darin, daß die mit ihr gewonnenen Normalwerte eines und desselben Tieres Schwankungen unterworfen sind, deren Größe (bis 100 Proz.), wenn als physiologisch angesehen, es verbieten würde, überhaupt aus einem Ausschlage bindende Schlüsse auf die Kausalität des vorgenommenen Eingriffs zu ziehen.

Es muß bei dieser Sachlage dem Arbeiten an Kaninchen mit akuten Fisteln der Vorzug gegeben werden. Außerdem aber wird durch eine periodische Reinjektion der sezernierten Galle in den Darmkanal, wie ich es l. c. beschrieben und begründet habe, eine dauernd gleichmäßige Gallenabsonderung gewährleistet.

Wie wichtig dieses scheinbar geringfügige Detail der Versuchsanordnung [die regelmäßige Reinjektion der in kurzen Perioden (15 bis 20 Minuten) sezernierten Galle in das Duodenum] ist, ergibt sich, abgesehen von den in der erwähnten Mitteilung beigebrachten Belegen, schlagend aus Versuchen *Petroffs*, welche in jüngster Zeit, nach Fertigstellung der vorliegenden Untersuchungen, herausgekommen sind. Ohne von meinen veröffentlichten Versuchen Kenntnis zu haben bzw. sie zu erwähnen, berichtet *Petroff*, daß an 15 bis 24 Stunden hungernden Kaninchen bereits 5 Stunden nach Beginn der dauernden Ableitung der Galle nach außen die Lebersekretion vollständig versiegt und sich nur durch Einbringen von Galle für einige Zeit wieder herstellen läßt. Bei gefütterten Kaninchen und bei Hunden tritt die Acholie ebenfalls, aber erst viel später ein. Allemal aber ist sie der Endpunkt einer vom Beginn der Ableitung nach außen allmählich zunehmenden Verminderung der Lebersekretion. Besser kann wohl nicht demonstriert werden, daß die Methode der akuten Fistel weitaus physiologischer ist als die der chronischen Fistel, deren Träger, selbst wenn man ihnen regelmäßig die sezernierte Galle ohne Verluste der Nahrung beimengt, sich in einem dauernd zunehmenden pathologischen Zustande hinsichtlich ihrer Lebersekretion befinden[1]). Damit verlieren

[1]) Das gilt insbesondere auch für den einzelnen Versuch, namentlich für jene Versuche, welche über längere Zeit ausgedehnt werden und die ganze sezernierte Galle zur Untersuchung gesammelt wird.

alle mit der Methode der chronischen Fistel gewonnenen neueren Ergebnisse jegliche Zuverlässigkeit, und bieten gegenüber der verflossenen Periode der Gallenstudien keinen Fortschritt.

Daß auch sonst die von mir gewählte Methode, insbesondere was die verwendete Urethannarkose betrifft, brauchbare, verläßliche Ergebnisse liefert, haben die seit meiner letzten Mitteilung wiederum ausgeführten zahlreichen Kontrollversuche mit aller wünschenswerten Sicherheit erwiesen. Wenn also meine Befunde über die Wirksamkeit verschiedener Substanzen von denjenigen der erwähnten Autoren, deren Angaben bei meinen eigenen Versuchen besprochen werden, abweichen, so kann ich die Schuld an diesen Differenzen nicht *meiner* Methode und der Tierart zuschreiben.

Auf eines sei hier noch hingewiesen: Zumeist wurden die Substanzen in den von anderen veröffentlichten Versuchen parenteral gereicht. Ich habe prinzipiell die Einführung in das Duodenum vorgezogen. Für die Bewertung namentlich chronisch darzureichender Pharmaka kommt in erster Linie der orale Weg in Betracht. Abgesehen davon, wäre von vornherein anzunehmen, daß die orale (intraduodenale) Darreichung die wirksamere ist, bei welcher die Substanzen unmittelbar in die Leber eintreten und dort zu einer bestimmten Zeit jedenfalls in einer größeren Konzentration anwesend sein werden, als nach parenteraler Zufuhr, nach welcher sie sich auf den ganzen Organismus verteilen[1]). Nach parenteraler Injektion gelangen die Substanzen außerdem, zum Teil wenigstens, auch auf einem anderen Wege (Arteria hepatica), möglicherweise auch an eine andere Stelle, in die Leber. Allerdings dürfte auch bei parenteraler Zufuhr eine größere Menge der Substanz auf dem indirekten Wege durch Darmarterien und Pfortader den normalen Weg einschlagen und demgegenüber die durch die Arteria hepatica eintretenden Substanzmengen kaum in Betracht kommen. Aber bei der intravenösen Injektion verteilt sich die gereichte Substanzmenge auf den ganzen Organismus, während sie bei der anderen Darreichungsart in toto die Leber erreicht und zweifellos dort zu einer bestimmten Zeit eine größere Konzentration erzielt werden kann, als nach parenteraler Zufuhr. Wie wichtig dieses Detail, namentlich für die Sekretinfrage ist, wird aus den weiteren Ausführungen und einer demnächst erscheinenden Mitteilung über die Pharmakologie der Sekretine hervorgehen.

Die im folgenden mitgeteilten Versuche wurden gleichzeitig mit jenen bereits veröffentlichten über die Wirkung der Salze im Jahre 1922 begonnen und im Jahre 1924 zu Ende geführt. Sie sind methodisch durch die Arbeiten von *Neubauer* (l. c.) angeregt worden und verfolgten

[1]) Es sei denn, daß es sich um Stoffe ausgesprochener Hepatotropie (Gallensäuren) handelt.

den Zweck, an einem möglichst reichhaltigen Material die grundsätzlichen Eigenschaften gewisser Substanzen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die *Gallensekretion*, unabhängig von dem Spiel der Gallenblase, der gröberen Ausführungsgänge und des *Oddi*schen Muskels unter möglichst physiologischen Verhältnissen zu studieren. Einerseits im Hinblick auf die so zahlreichen empirischen Heilmittel, denen eine Anregung der Gallensekretion zugeschrieben wird, andererseits im Hinblick auf die Möglichkeit, Substanzen aufzufinden, welche die Zusammensetzung der Galle, insbesondere ihre Konzentration zu verändern imstande wären. Es wurden daher nicht nur irgendwie zur Gallensekretion in Beziehung gebrachte Substanzen und Drogen, sondern auch solche untersucht, die bislang zu derartigen Zwecken nicht verwendet worden sind, insbesondere solche, deren Wirkung ein Licht auf die Physiologie der Gallensekretion werfen konnte. Schließlich habe ich auch die von *Pawlow* und seiner Schule studierte Wirkung der Einführung von Nahrungsstoffen mit in den Kreis meiner Versuche einbezogen. Das Ergebnis dieser Versuche konnte auch die Brauchbarkeit der Methode erweisen und damit die pharmakologischen Ergebnisse sichern.

Die Bedeutung der heute als Sekretine bezeichneten physiologischen Drüsenerreger, die sich im Laufe der Untersuchungen ganz besonders aufdrängte, führte zu zahlreichen Versuchen mit dieser Substanzengruppe, verknüpft mit chemischen Experimenten zur Aufklärung der Natur dieser Stoffe, welche hier nur in ihren physiologischen Ergebnissen mitgeteilt werden sollen, wobei hervorgehoben sei, daß die Verfolgung der Lebersekretion sich als ein bequemes Mittel zur Prüfung von Sekretinwirkungen ergeben hat.

In diese Substanzengruppe gehören pharmakologisch wahrscheinlich auch gewisse Vitamine, die ich mangels geeigneten Materials noch nicht in den Kreis meiner Untersuchungen habe ziehen können.

Schließlich schwebte uns, wie bei allen pharmakologischen Untersuchungen, die Möglichkeit vor, neue Anhaltspunkte für das physiologische Geschehen der Gallenbereitung und -absonderung zu gewinnen.

Es ist gelungen, die Methode durch die systematische Reinjektion der in kurzen Zeiträumen sezernierten Galle in das Duodenum derart auszugestalten, daß die als Versuchstiere dienenden Kaninchen eine über mehrere Stunden gleichbleibende Sekretionsgeschwindigkeit zeigen. Die sonstigen Einzelheiten der Methode, insbesondere die Narkose, sind als die Versuchsergebnisse in keiner Weise beeinflussend oder trübend erkannt worden. Schließlich wurde durch eine Injektion von Galle oder gallensauren Salzen am Schlusse des Versuchs zum Zwecke der Prüfung der normalen Reaktionsfähigkeit der Versuchstiere eine sehr wünschenswerte Sicherung negativer Versuchsergebnisse eingeführt.

So schienen alle Vorbedingungen erfüllt, um mit Hoffnung auf Erfolg die bisher so dürftigen experimentellen Grundlagen der Pharmakologie der Gallensekretion zu erweitern. Auf ihnen sollte die *rationelle* Anwendung der bislang in der Klinik verwendeten galletreibenden Mittel aufgebaut und das Wertlose aus diesem Teile der Materia medica ausgeschaltet werden. Es ist wohl denkbar, daß die Beeinflussung der Gallensekretion als solche gar nicht das therapeutisch maßgebende sein muß, sondern gleichsam nur einen Indikator für eine gleichsinnige Beeinflussung der Gesamttätigkeit der Leber darstellt.

Hinsichtlich der methodischen Einzelheiten kann ich auf meine erwähnte Mitteilung verweisen. Ich hebe hier nur hervor, daß außer dem Gallenvolumen nur noch und auch dies nicht durchgehends, die Konzentration der Galle gemessen wurde, deren Änderungen nicht nur von pathologischem und therapeutischem Interesse, sondern auch von Bedeutung für die Physiologie der Sekretion als solche sein könnte. Über den so wichtigen Punkt der Konzentration der Galle sind systematische Untersuchungen kaum noch mitgeteilt. Ich verweise in dieser Beziehung auf meine erste Mitteilung, aus der hervorgeht, daß eine Verdünnung der Galle, wenn überhaupt, durch pharmakologische Eingriffe nur sehr selten zustande kommen dürfte, ich selbst habe sie nie gesehen. Es besteht ein grundsätzlicher Unterschied hinsichtlich der Ausscheidung fester Substanzen und Wasser zwischen Niere und Leber, welch letztere nicht nur beim Kaninchen, sondern wahrscheinlich bei allen Tieren, auch selbst wenn sie nur eine intermittierende Gallensekretion haben, quoad bewegter Wassermassen die Niere weitaus übertrifft.

Alle anderen noch so wünschenswerten Untersuchungen, namentlich hinsichtlich des Gehaltes an Farbstoff und Säuren, mußten wegen der streng einzuhaltenden regelmäßigen Wiedereinverleibung der sezernierten Galle unterbleiben; denn es war mir trotz aller Bemühungen nicht gelungen, den Farbstoff der Galle in kleinen Mengen messend zu verfolgen, und hinsichtlich der Säuren hatte *Neubauer* festgestellt, daß die vorläufig als einzige in Betracht kommende Methode der Messung der Oberflächenspannung keine bindenden Schlüsse auf die Menge der Säuren zuläßt. Die Hauptschwierigkeit bei der Kolorimetrie der Kaninchengalle bildet die ungemein rasche Veränderlichkeit der Farbe, die es nicht einmal gestattet, während eines Versuchs die Galle selbst als Maß zu nehmen. Immerhin konnten durch bloße Betrachtung einige Feststellungen hinsichtlich der Gallenfarbe und ihrer Veränderungen gemacht werden. Selbst bei starker Vermehrung des Gallenvolumens durch irgend ein Agens, ebensowenig beim Sinken der Gallenmenge wurde eine Veränderung der Farbintensität beobachtet. Allerdings verhindert die ungemein intensive Färbung der normalen

Galle eine genaue Beobachtung. Immerhin ist aber dieses Verhalten der Farbe im Hinblick darauf bemerkenswert, als das Verhalten der Konzentration erwarten ließe, daß bei Gallenvermehrung eine Vertiefung, bei Verminderung eine Aufhellung auftreten sollte. Es scheint sich also der Farbstoff an den Schwankungen des Trockengehaltes nicht wesentlich zu beteiligen[1]). Wiederholt wurden aber Veränderungen im Farb*ton* beobachtet, so beim Übertritt gewisser gefärbter Pflanzenstoffe, wobei die Galle gelb bis braun wurde. Bemerkenswert ist die Schnelligkeit, mit der ein solcher Übertritt von Stoffen in die Galle stattfindet; so sah ich einmal bereits 6 Minuten nach Einverleibung der Lösung in das Duodenum eine solche Verfärbung durch Frangulaglucoside. Eine andere Art von Farbtonänderung trat sozusagen mit Sicherheit in jedem Falle ein, wo es sich sichtlich um eine Leberschädigung handelte, die sonst grüne Galle wurde gelb. Man konnte diese nicht durch Übertritt fremder Substanzen bedingte Verfärbung geradezu prognostisch für eine wesentliche Herabsetzung der Gallensekretion verwerten. Besonders deutlich trat diese Gelbfärbung nach Amylalkohol, Chinin, Chloroform, Natriumnitrit, nach größeren Blutverlusten auf und charakterisierte die auffällig geringe Galle beim unblutig dekapitierten Tiere[2]).

Die Untersuchung des Schleim- und Gesamteiweißgehaltes habe ich bald (s. erste Mitteilung) als völlig nutzlos aufgegeben. Der Eiweißgehalt der normalen, schleimfreien Galle ist bei allen Versuchstieren und beim Menschen minimal. Seine Schwankungen, wenn sie überhaupt vorkommen und sich einwandfrei feststellen ließen, dürften wohl kaum eine irgendwie in Betracht kommende Bedeutung für die Beurteilung von Substanzwirkungen auf die Lebersekretion haben. Insbesondere gilt das vom Schleimgehalt der Galle, welcher, zweifellos den Gallenwegen entstammend, für die Galle als Verdauungssekret ebensowenig in Betracht kommt als der Eiweißgehalt. Damit soll aber keineswegs die Bedeutung dieser beiden mit dem Lebersekret als solchem nur zufällig verbundenen Gallenbestandteile für gewisse pathologische Zustände geleugnet werden. Abgesehen davon, daß

[1]) Aber es können gewichtsmäßig nicht mit Sicherheit nachweisbare Zunahmen des Farbstoffgehaltes bereits mit einer beträchtlichen Zunahme der Farbintensität verbunden sein: nach intravenöser Injektion von kristallisiertem Hämoglobin wurde ohne Änderung des Gallenvolumens und ohne sichere Zunahme des Trockengehaltes eine beträchtliche Vertiefung der im Ton unveränderten Gallenfarbe hervorgerufen. Diese Beobachtung beweist schlagend, daß es unzuverlässig ist, aus dem Farbstoffgehalt allein irgendwelche Schlüsse auf die Menge der sezernierten Galle zu ziehen, was von klinischer Seite immer wieder geschieht.

[2]) Die Dekapitation erfolgte ohne Blutverlust durch Abklemmen mit der *Tigerstedt*schen Zange.

Änderungen in der Sekretionsgeschwindigkeit keineswegs eine Änderung dieser beiden Bestandteile zur Folge haben können, besteht keine Möglichkeit, aus den Refraktometerwerten irgendwelche Schlüsse zu ziehen.

Die absichtliche Beschränkung auf Messung von Menge und Konzentration der Galle in den vorliegenden Versuchen ergab sich daher nicht nur aus dem Mangel an Untersuchungsmaterial bei meiner Methode der Reinjektion, sondern auch aus der Kritik der bezüglichen Bestimmungsmethoden und Verwertbarkeit ihrer Resultate.

Noch auf zwei Punkte wäre einzugehen. Der eine betrifft den Einfluß der Atmung und der andere den der angewandten Narkose. Auf den Einfluß der Atmung wiesen zahlreiche Autoren, namentlich *Bürker*, hin, in letzter Zeit hat besonders *Petroff* den Einfluß der Atmung hervorgehoben, welchen sie auf die Geschwindigkeit der Tropfenfolge der Galle haben soll. Zweifellos hängt die Tropfenfolge mit der Atmung bzw. Zwerchfelltätigkeit rein mechanisch zusammen, was jedem leicht verständlich ist, der die Beeinflussung des Abtropfens durch jede auch noch so geringfügige Lageänderung der Kanüle erlebt hat. Dementsprechend ist die in ganz kurzen Perioden von 1 Minute und weniger erhaltene Gallenmenge sehr großen Schwankungen unterworfen. Werden jedoch Perioden mittlerer Dauer wie in meinen Versuchen (15 bis 20 Minuten) gewählt, so verschwinden diese Schwankungen vollständig, wie auch *Petroff* feststellen konnte. Damit gewinnt man auch ohne Anwendung der künstlichen Atmung ein reines, von der Atemmechanik ungetrübtes Bild der Sekretionstätigkeit in Perioden, die kurz genug sind, um auch rasch vorübergehende Änderungen nicht übersehen zu lassen. Es muß aber beachtet werden, daß eine weitere Verlängerung der Messungszeit über das durch die Atmung gebotene Maß hinaus wieder von Nachteil ist, da sich einerseits verhältnismäßig rascher verlaufende Schwankungen (und die sind nicht so selten) der Erkennung entziehen müssen, andererseits aber der natürliche Kreislauf der Galle zu sehr gestört würde. Ganz unzulässig aber erscheint es uns, aus irgend einer Versuchsperiode die 24stündige Gallenmenge zu berechnen und aus diesem Produkt eine Grundlage für irgendwelche Schlüsse zu ziehen.

Dem Studium der Wirksamkeit der Narkotica der Alkoholreihe habe ich besondere Sorgfalt gewidmet. Nicht nur in Anbetracht der Möglichkeit einer Verfälschung primärer Substanzwirkungen durch das Narkoticum, sondern auch im Hinblick namentlich auf die Wirkung der von *Whipple*[1]) betonten und studierten Chloroforminhalationen auf die Leber war dies geboten. Es lag ja nur zu nahe, von denen Anderer abweichende Versuchsergebnisse darauf zurückzuführen, daß ich an

---

[1]) Journ. of biol. Chem. 50, 513. 1922.

narkotisierten Tieren gearbeitet habe. Alle Versuche aber, die unternommen wurden, einen etwaigen Einfluß der von mir, ebenso wie von *Pohl* und *Neubauer* verwendeten Urethannarkose auf die Lebersekretion festzustellen, haben ausnahmslos dazu geführt, sich von der vollkommenen Einflußlosigkeit des Urethans auf die Lebersekretion zu überzeugen. Immerhin könnte es in manchen Fällen erwünscht sein, ohne Narkose zu arbeiten. Ich habe in zwei Fällen an Tieren gearbeitet, die nur während der kurzen Zeit der Bauchoperation im Ätherrausch gehalten worden waren: wenn dies auch durchführbar ist, so macht die leicht eintretende Unruhe der Tiere und damit verbundene Möglichkeit einer Verlagerung der Ausflußkanüle bei den zumeist viele Stunden dauernden Versuchen eine Narkose geradezu unumgänglich. Zweimal habe ich versucht, ohne Narkose am dekapitierten Tiere zu arbeiten, beidemal war aber die Gallensekretion nicht nur gering, sondern so unregelmäßig, daß die Grundlage für Messungen nicht gegeben war. Es war nicht nötig, diesen Weg weiter zu verfolgen, da sich die bei allen übrigen Versuchen angewandte Methode der Urethannarkose als einwandfrei erwiesen hatte und im Falle des Atophans die Versuche am narkotisierten und nicht narkotisierten Tiere das gleiche Ergebnis geliefert haben.

Ehe ich die Ergebnisse der pharmakologischen Versuche darstelle, möchte ich noch kurz einige Beobachtungen zur Physiologie der Gallensekretion des Kaninchens mitteilen, welche sich anläßlich der im ganzen fast 200 Versuche ergaben, soweit sie nicht schon in der vorhergegangenen Mitteilung Platz gefunden haben.

Die große Zahl der Versuche, denen allen eine verhältnismäßig lange Normalperiode voranging, gab mir die willkommene Gelegenheit, die Sekretionsgröße der Kaninchenleber zu definieren[1]). Aus 166 Einzelbeobachtungen an ebenso vielen Kaninchen ergab sich eine mittlere Stundengeschwindigkeit von 8,7 g $\pm$ 0,68 Galle. Die der Berechnung zugrunde liegenden Einzelwerte sind nicht etwa aus einer kürzeren Periode berechnet, sondern stellen die Summe der tatsächlich innerhalb einer Stunde gemessenen Periodenwerte dar. Von einer Reduktion auf die Einheit des Körpergewichts wurde Abstand genommen, da,

[1]) Es ist eigentlich verwunderlich, wie wenig man sich noch mit der Definition physiologischer Größen befaßt hat. In fast allen Fällen sind über solche nur Angaben bekannt, die sich nicht auf eine genügend große Zahl von Messungen normaler Werte stützen, um den den Einzelwert und Mittelwert belastenden Fehler, was hier der physiologischen Schwankungsbreite entspricht, zu berechnen. Ganz abgesehen davon, daß derartige Untersuchungen die Grundlage für gesicherte Schlüsse aus Beobachtungen quantitativer Art abgeben, erscheint es aus allgemeinen Gründen wünschenswert, keine Gelegenheit vorübergehen zu lassen, um eine gegebene physiologische Größe zu definieren.

wie ich schon l. c. hervorgehoben habe, es keinen Einfluß auf die Sekretionsgröße erkennen läßt, was übrigens auch *Petroff* neuestens beobachtet hat. Die extremen von mir beobachteten Werte waren 3,2 g als kleinster und 16 g als größter Stundenwert, doch sind solche Extreme sehr selten. Die meisten Tiere zeigten eine Geschwindigkeit von 8 bis 10 g Galle pro Stunde. Der *Einzelwert* ist mit einem mittleren Fehler (physiologische Schwankungsbreite) von $\pm 2{,}9$ g belastet. Das bedeutet, daß man alle Werte, die über diese Schwankungsbreite von etwa 3 g Galle pro Stunde hinausgehen, also $>$ 12 g und $<$ 6 g als abnorm bei irgend einem Kaninchen anzusehen berechtigt ist. Die Sekretionsgeschwindigkeit des Kaninchens als Spezies ist also, wie man sieht, auf nur 34 Proz. genau definiert. Ganz anders dagegen verhält sich die Sekretionsgeschwindigkeit ein und desselben Individuums, wenn man die regelmäßige Reinjektion der entleerten Galle in das Duodenum vornimmt. Diese *individuelle* Sekretionsgröße schwankt nur sehr wenig. Aus der Berechnung eines Normalversuchs mit 15 Einzelbeobachtungen ergibt sich ein Mittelwert pro 15 Minuten von 2,46 g $\pm$ 0,006 Galle und damit eine Definition auf 2,4 Proz. genau. Daher muß man wie bereits l. c. gesagt, die Galle auf mindestens 0,01 g genau wägen. Die Werte können auf Dezigramm abgerundet werden. Eine größere Genauigkeit der Wägung wäre als der Definition des Wägungsobjekts nicht entsprechend methodisch fehlerhaft.

Alter, Größe und Geschlecht der Tiere waren, wie gesagt, ohne erkennbaren Einfluß auf die Größe der normalen Lebersekretion, auch die Art der Ernährung (Grünfutter, Hartfutter und gemischtes Futter) schienen bedeutungslos. Doch sind systematische Versuche zu diesem Zwecke nicht angestellt worden.

Nur eine wichtige Tatsache konnte festgestellt werden, die von Einfluß auf die Größe der normalen, durch keinerlei Eingriff beeinflußten Gallensekretion zu sein scheint. Es wurde beobachtet, daß puerperale Tiere, besonders aber säugende Muttertiere, eine auffallend große Gallensekretion gegenüber der Norm darboten. Bei 5 von 7 Tieren betrug der Stundenwert zu Beginn des Versuchs: 18, 22, 25, 26 und in einem Falle sogar 30 g. Nach dem eben Ausgeführten sind diese Werte als abnorm hoch zu bezeichnen. Derartig hohe Werte (diese Tiere sind in die Berechnung der normalen Sekretionsgröße nicht aufgenommen worden) fand ich außerdem noch ein einziges Mal bei einem gleichfalls für die Berechunng nicht berücksichtigten männlichen Tiere (22,6 g pro Stunde), welches mir außerdem durch seine abnorm kleinen Hoden als von der Norm abweichend aufgefallen war. Außer der großen Sekretionsgeschwindigkeit zeigten diese puerperalen Tiere auch noch eine sonst niemals beobachtete Neigung zur spontanen Steigerung der Sekretion während des Versuchs mit gleichzeitigem Anstieg des

Trockenwertes. Puerperale Tiere dürfen daher wegen dieser Neigung zu spontanen Änderungen der Sekretionsgeschwindigkeit zu messenden Versuchen nicht verwendet werden. Es scheint irgend ein Zusammenhang zwischen Milchproduktion und Gallensekretion zu bestehen. Dahin gerichtete Untersuchungen mit Extrakten der menschlichen Placenta und der Ovarien, die Gallensekretion normaler Tiere anzuregen, blieben bisher ergebnislos, wobei dahingestellt sein mag, ob die verwendeten Extraktfraktionen, wenn sie auch aus frischen Organen gewonnen worden waren, die Inkrete der betreffenden Drüsen in der Tat enthalten haben, da eine Prüfungsmethode für diese Inkrete bisher nicht bekannt ist. Trächtige Tiere zeigten nicht die erwähnten Abweichungen von der Norm. Die Unwirksamkeit verschiedener Präparate innersekretorischer Drüsen fand *Specht*, allerdings am Hund mit Dauerfistel, *Alpern* fand ähnliches, nur eine Hemmung vom Pituitrin.

Der Trockengehalt der normalen Kaninchengalle schwankt von 1,3 bis 2,2 Proz., die Mehrzahl der untersuchten Gallen hatte einen solchen von 1,6 bis 1,8 Proz., wobei hohe Werte bei kleiner und bei großer Sekretionsgeschwindigkeit gefunden wurden. Ich verfüge nicht über genügend Einzeluntersuchungen, um einen mittleren Konzentrationswert nach Analogie des Sekretionswertes berechnen zu können. Die Konzentration weist also keine Abhängigkeit von der Sekretionsgeschwindigkeit auf, so daß jenes fast ausnahmslos geltende Gesetz von der Kuppelung der Konzentration und Geschwindigkeit nur für ein und dasselbe Individuum Geltung hat, nicht aber für Gallen verschiedener Individuen.

II.

Im folgenden werden an Hand von die Resultate zusammenfassenden Tabellen die einzelnen Gruppen der untersuchten Substanzen besprochen werden. Untersucht wurden:

1. Vertreter der drei Gruppen von *Nahrungsstoffen* (Kohlehydrate, Eiweißkörper und Fette, anschließend Sekretine), allgemein gebrauchter *Genußmittel* (Coffein und Nicotin) und der mit der Nahrung aufgenommenen *Gewürze* (Pfeffer, Paprika, Zwiebel), *Galle* und *gallensaure Salze*.

2. *Alkali-* und *Erdalkalisalze* verschiedener anorganischer und organischer Säuren. Von in diese Gruppe gehörigen *Mineralwässern*, welche solche Salze enthalten, das Karlsbader Mineralwasser.

3. *Narkotica* der Alkoholreihe.

4. *Ätherische Öle.*

5. *Organische Abführmittel* und anschließend die Folgen einer entzündlichen *Reizung* der *Darmschleimhaut.*

6. Einige indifferente *Bitterstoffglucoside.*

7. Einige *Alkaloide.*

Tabelle I [1]).

Substanz	Dosis, Applikationsart, Zahl der Versuche	Wirkung auf Menge	Wirkung auf Konzentration	Bemerkungen
Wasser, physiologische Salzlösung *)	bis 50 ccm iv	keine	keine	
	„ 100 „ id	„	„	
Glucose	10 proz. Lsg. 20 ccm id (3 V)	„	„	
	10 „ „ 30 „ id (1 V)	„	„	
	10 „ „ 20 „ iv (1 V)	geringe Vermehrg.	Vermehrung	
Aminosäuren	Gemenge von je 0,25 g Glykokoll, Tyrosin, Leucin, Glutaminsäure in $NaHCO_3$-Lsg. id (1 V)	keine	keine	
Wittepepton	1 g in 5 proz. Lsg. id (2 V)	Vermehrung	Vermehrung	
„ abiurete Fraktion	id (1 V)	„	„	entsprechend 10 g Wittepepton
Liebigs Fleischextrakt	2,5 g in 10 ccm Lsg. id (1 V)	„	„	
Spinatsekretin	id und iv (mehrere V)	„	„	entsprechend 5 bis 10 g Trockenspinat
Duodenalsekretin	id und iv (2 V)	„	„	nach *Bayliss-Starling* hergestellt
Histaminchlorhydrat	1 mg iv (1 V)	„	„	
	2 „ id (1 V)	„	„	durch 1 mg Atropin. sulf. vorübergehend abgeschwächt
Fett	2 g, 5 g, 10 g Olivenöl id (5 V)	Verminderung	keine oder geringe Verminderung	
Seife	1 u. 2 proz. Lsg. Natrium oleinicum 10 ccm id (2 V)	keine	keine	
Gewürze	0,2 g Pulvis Fr. Capsici id (1 V)	„	„	
	0,4 g „ „ Piperis id (1 V)	„	„	
	0,2 g Zwiebelsirup id (1 V)	„	„	
	1,0 g „ id (1 V)	Verminderung	Verminderung	Vermehrung des Succus entericus
Genußmittel	1 mg und 2 mg Nicotinum tart. id	keine	keine	
	0,1 g Coffein. pur. 1 proz. Lsg. iv (1 V)	geringe Vermehrg.	geringe Vermehrg.	
	0,3 g „ „ 1 „ „ iv (1 V)	keine	keine	
	0,1 g „ „ 1 „ „ id (1 V)	„	„	

*) Aus der vorangegangenen Mitteilung (*Stransky*, l. c.) entnommen.

[1]) Für diese und alle folgenden Tabellen gilt iv = intravenös, id = intraduodenal, Lsg. = Lösung in Wasser, (— V) = Anzahl der Versuche.

8. Einige andere *chemische Präparate*, von denen in neuer und neuester Zeit eine Einwirkung auf die Gallensekretion behauptet wurde.

1. Nahrungsstoffe, Genußmittel, Gewürze, Galle. (*Tabelle I.*)

Über den Einfluß von Wasser und physiologischer Salzlösung ist bereits l. c. von mir berichtet worden, der Vollständigkeit und Übersicht wegen sind sie in die Tabelle aufgenommen worden. Sie sind ohne ersichtlichen Einfluß auf die Gallensekretion und -konzentration. Zum Unterschied von der Niere ist die sekretorische Tätigkeit der Leber unabhängig vom Wasserangebot an den Organismus. Ob allerdings die dadurch verursachte Hydrämie auch im Portalblut besteht, ist nicht untersucht. *Specht* fand beim Fistelhunde die gleichen Verhältnisse. *Petroff* gibt an, daß bei durch Hunger und dauernde Gallenableitung acholisch gemachten Kaninchen allerdings erst große Wassermengen die Gallenabsonderung wieder in Gang zu bringen vermögen.

An Kaninchen, welche sich sozusagen dauernd im Zustande der Verdauung befinden, ist der Einfluß der drei Nährstoffgruppen noch nicht systematisch untersucht worden. Meine Versuchsergebnisse lassen sich daher nicht unmittelbar mit den von *Pawlow*[1]) und den späteren Autoren vergleichen, welche an nüchternen Hunden arbeiteten. Bei diesen Tieren setzt mit *jeglicher* Nahrungsaufnahme eine Tätigkeit der Leber mit der aller anderen Verdauungsdrüsen ein. Der spezifische Einfluß der chemischen Natur der einzelnen Nahrungsstoffe auf die Lebersekretion kann sich aber hierbei nicht äußern, weil die Acidität des aus dem Magen austretenden Chymus immer (via Sekretin) die Lebersekretion anregen muß. Nur hinsichtlich der (intraduodenalen) Albumosen(darreichung) ist ein Vergleich möglich, der denn auch, wie ersichtlich, zeigt, daß ebenso wie beim Hunde auch beim Kaninchen die Gallensekretion durch die Produkte der peptischen Magenverdauung des Eiweißes intensiv angeregt wird.

Die Glucose, als Repräsentant der Kohlehydrate untersucht, ist in jenen Mengen, welche bei der Nahrungsaufnahme in Betracht kommen, wohl indifferent. Erst bei großen, intravenös gegebenen Dosen konnte eine leichte Steigerung des Gallenvolumens und eine nicht unbeträchtliche Zunahme des Trockengehaltes beobachtet werden. Dabei kam es aber nicht zu einer Zuckerausscheidung durch die Galle, denn die Untersuchung mittels der *Bang*schen Mikromethode ergab keine Steigerung der normal vorhandenen geringen Reduktionsgröße der Galle, welche etwa 0,020 g Glucose pro 100 g Galle entsprach, also viel geringer ist als die Reduktionsgröße des Blutes.

Die Eiweißkörper gelangen im normalen Verlauf nur in Form ihrer Magenverdauungsprodukte, den Albumosen und den Darmverdauungsprodukten, den Aminosäuren, zur Einwirkung auf die Gallensekretion. Ich habe daher nicht genuines Eiweiß, sondern bloß die genannten Abbaustufen untersucht. Reine Aminosäuren erwiesen sich, intraduodenal gereicht, als wirkungslos. Dagegen hatte das Wittepepton wie bei den anderen Untersuchern am Hunde auch in meinen Versuchen am Kaninchen stets eine deutliche sekretionsfördernde Wirkung. Es erscheint jedoch zweifelhaft, ob diese Wirkung tatsächlich den Albumosen als solchen zuzu-

[1]) Siehe *Babkin*, Sekretion der Verdauungsdrüsen. Berlin, Springer, 1914.

schreiben ist. Ganz abgesehen davon, daß *Abel* und seine Mitarbeiter[1]) gefunden haben, daß bei jeglicher Art der Eiweißhydrolyse Substanzen entstehen, welche sich durchaus so wie das stark sekretionsfördernde Histamin verhalten und auch im Wittepepton gefunden wurde, habe ich aus dem in meinen Versuchen als Albumosenpräparat verwendeten Wittepepton mit der gleichen Methode, welche sich mir zur Isolierung der Sekretine im allgemeinen bewährt hatte, eine fast abiurete Fraktion isolieren können, welche sekretionsfördernd gewirkt hat und die von *Pauly* angegebene Imidazolreaktion in ausgesprochener Weise zeigte. Die von dieser Fraktion befreiten Albumosen habe ich zwar nicht physiologisch untersucht, aber das Ausmaß der Wirkung sprach durchaus dafür, daß die Wirkung des Wittepeptons nicht den Albumosen, sondern dieser Beimengung von Stoffen zukommt, die wir wohl zu den Sekretinen zu rechnen berechtigt sind, wobei aber der noch unentschiedene Streit, ob das oder die Sekretine mit Histamin identisch sind, unberücksichtigt bleibe. Ich glaube daher, daß die bekannte sekretionsfördernde Wirkung der Albumosen nicht ihnen, also den primären Spaltungsprodukten der Eiweißkörper zukommt, sondern den offenbar in den meisten Nahrungsmitteln vorkommenden Sekretinen. Immerhin erfordert aber die Wichtigkeit dieses Gegenstandes eine eingehende Untersuchung mit von Sekretinen befreiten Albumosen, ehe man mit aller Sicherheit wird schließen können, daß den Eiweißkörpern als solchen ebensowenig wie den Kohlehydraten eine Beeinflussung der Gallensekretion eignet.

Was die Sekretine anbelangt, so habe ich das *Bickel*sche Spinatsekretin untersucht, an welchem die erwähnte, anderweitig noch mitzuteilende Darstellungsmethode ausgearbeitet worden ist, dann die aus Wittepepton darstellbaren wirksamen Fraktionen und das nach *Bayliss* und *Starling* aus Darmschleimhaut dargestellte Sekretin. Daß Sekretin auf die Gallensekretion wirkt, wurde zuerst von *Henri* und *Portier*[2]) mit dem Sekretin der Dünndarmschleimhaut von *Starling* und *Bayliss*[3]) festgestellt. Immer aber wurden die Sekretine subkutan oder intravenös gereicht. Demgegenüber sei hier, ohne der in Aussicht gestellten ausführlichen Publikation vorzugreifen, hervorgehoben, daß die Sekretine ebenso prompt beim Einbringen in das Duodenum wirksam sind wie bei parenteraler Zufuhr. Dieser Umstand ist geeignet, den oben gezogenen Schluß zu stützen, daß die Sekretionswirkung der eiweißhaltigen Nahrungsmittel nicht den Eiweißkörpern, sondern den beigemengten Sekretinen zuzuschreiben ist. Wenn auch bei diesen Versuchen der Resorptionsweg direkt zu den Leberzellen führt und daher vielleicht kein wesentlicher Unterschied zwischen der intravenösen und intraduodenalen Applikation bestehen dürfte, so haben diese Versuche doch dazu angeregt, die Möglichkeit einer *direkten* Einwirkung der Sekretine auf die Magensaftsekretion zu prüfen. Die von klinischer Seite am Menschen angestellten Versuche ergaben in der Tat, daß Spinatsekretin, in den Magen eingebracht, eine starke Anregung der Magensaftsekretion zur Folge hat. Damit ist es auch wahrscheinlich gemacht, daß die Wirkung, welche die Nahrungsstoffe bei Berührung mit der Magenschleimhaut auf die Magensekretion hervorrufen (*Pawlow*), durch die in den Nahrungsmitteln enthaltenen Sekretine hervorgerufen wird und nicht durch die Nahrungsstoffe als solche.

[1]) Journ. of pharm. and exper. therap. **15**, 401, 1920.
[2]) *Henri* und *Portier*, C. r. Soc. de biol. 1902, S. 620.
[3]) *Bayliss* und *Starling*, Journ. of Physiol. 28, 325, 1902.

An dieser Stelle ist nochmals des Histamins zu gedenken, welches zwar nicht ein Eiweißabbauprodukt, aber als Derivat des Histidins in einer Beziehung zu den Eiweißkörpern steht, welche möglicherweise nicht nur in bakterieller Zersetzung ihren Grund hat. Es erwies sich als regelmäßig stark sekretionsfördernd, so daß uns die Beobachtung der Gallensekretion geradezu als ein Mittel diente, den histaminartigen Charakter gewisser, damals im hiesigen Institut studierter, reaktionell dem Histamin nahestehender Substanzen zu beurteilen. Die Histaminwirkung auf die Lebersekretion läßt sich durch nachträgliche Atropingabe abschwächen. Diese Untersuchungen wurden schon vor meiner ersten Mitteilung angestellt, aber nicht veröffentlicht. Mittlerweile hat *Alpern* bei *Bickel* seine Untersuchungen über die Wirkung des Histamins beim Hunde veröffentlicht, welche zu dem gleichen Resultat geführt haben. Ich kann daher die Angaben *Alperns* hinsichtlich der Histaminwirkung und deren Beeinflußbarkeit durch Atropin bestätigen. Die Beeinflußbarkeit der Histaminwirkung durch Atropin ist unter Berücksichtigung der Wirkungslosigkeit parasympathischer Gifte überhaupt (s. *E. Neubauer*, l. c.) auf die Lebersekretion bemerkenswert. Ob aber hier eine Möglichkeit vorliegt, Histamin- und Sekretinwirkung experimentell auseinander zu halten, erscheint mir auf Grund meines allerdings nur vorläufigen Versuchsmaterials noch zweifelhaft.

Olivenöl als Vertreter der Fette hatte eine durch Kontrollen sichergestellte, deutlich hemmende Wirkung ohne wesentliche Beeinflussung der Konzentration. Ob diese Wirkung dem Fette als solchem, also dem Gemenge von Triglyceriden verschiedener Fettsäuren, oder einer Beimengung zukommt, konnte nicht entschieden werden. Verwendet wurde Olivenöl bester Qualität, andere Fette wurden nicht geprüft. Es bleibt daher ein Vergleich verschiedener Fette hinsichtlich dieser Wirkung noch auszuführen. Die Wirkung ist um so bemerkenswerter, als sie an einer Seifenlösung (reines ölsaures Natrium von *de Haen*) nicht festgestellt werden konnte, im Gegensatz zu der Anschauung vieler Autoren. Es war daran zu denken, daß diese Ölwirkung etwa durch Verhinderung der Rückresorption der Galle zustande kommt, doch ist es nicht gelungen, dies festzustellen, denn die Wirkung intraduodenal gereichter Überschußgalle wurde durch eine gleichzeitige Ölgabe nicht vermindert. Die Wirkungslosigkeit der Seife spricht eher dafür, daß es sich um die Wirkung einer Beimengung im Öl handelt, oder aber es erreicht unverseiftes Fett die Leber. Da die Seifen als unwirksam befunden wurden, muß ich die immer wieder verwendeten, aus ölsaurem Natrium bestehenden Präparate als unwirksam ablehnen, während die so vielfach angewendeten Ölkuren bei geeigneten Fällen sehr wohl durch die Sekretionshemmung, also eine Ruhigstellung der sekretorischen Tätigkeit der Leber, von therapeutischer Bedeutung sein könnten.

Die untersuchten *Gewürze* erwiesen sich als wirkungslos: Pfeffer und Paprika wurden, als Pulver in Wasser suspendiert, ins Duodenum injiziert, die Zwiebel als eingedickter wässeriger Extrakt. Dieser Extrakt roch deutlich nach Zwiebel und war daher nicht frei von ätherischem Zwiebelöl, möglicherweise aber arm daran. Der Zwiebelextrakt samt dem der Verdampfung entgangenen Reste ätherischen Öles, welches in chemischer Konstitution und pharmakologischer Wirkung bekanntlich die größte Ähnlichkeit mit dem Senföl hat, erzeugte eine deutliche, bei der nachträglichen Sektion festgestellte Hyperämie der Dünndarmschleim-

haut. Auf diesen möglicherweise durch das ätherische Öl bedingten Befund sei mit Rücksicht auf die später besprochene Wirkung von entzündlicher Schleimhautreizung, speziell durch Senföl, hingewiesen. Pfeffer und Paprika wirken trotz ihres scharfen Geschmacks nicht entzündungserregend und hyperämisierend, wie *Stary*[1]) im hiesigen Institut gezeigt hat, sondern verdanken ihren feurigen Geschmack einer spezifischen Erregung der Endigungen der Wärmenerven. In bestätigender Ergänzung zu seinen Versuchen möge hervorgehoben werden, daß im Gegensatz zu Zwiebel und Senf nach Einführung von Paprika und Pfeffer ins Duodenum keine Hyperämie der Darmschleimhaut zu beobachten war. Die Bedeutung der genannten Gewürze in der „Bromatik“ (*Paul*, Die Lehre von der Bereitung der Speisen), Diätetik und Therapie dürfte daher nicht auf dem Wege einer Beeinflussung der Gallensekretion zu finden sein. Wenn in der Darmschleimhaut Wärme perzipierende Nervenendigungen vorhanden sein sollten, so hat ihre Erregung durch diese Stoffe jedenfalls keine (reflektorische) Wirkung auf die Gallensekretion, und das gilt nicht nur für Paprika und Pfeffer, sondern wohl auch für den Senf und andere Senföl enthaltende Gewürze und Gemüse, wie Knoblauch, Rettich, Radieschen, Meerrettich usw. In den zu Speisezwecken verwendeten Konzentrationen dürften sie wohl keine andere Wirkung als die Erregung wärmeperzipierender Nervenendigungen hervorrufen, welche, wie *Stary* ausgeführt hat, beim Senf usw. als Teil- oder Prodromalstadium einer Entzündungserregung, bei Paprika usw. isoliert als einzige Wirkung hervortritt[2]).

An die Besprechung der Nahrungsstoffe und Gewürze möge ein kurzer Bericht über die wirksamen Bestandteile allgemein benutzter, insbesondere auch im Anschluß an die Nahrungsaufnahme verwendeter *Genußmittel* angeknüpft werden, von denen ein gewisser Einfluß auf den Ablauf der Verdauungsvorgänge mehr oder weniger ausgesprochen von den sie benutzenden Personen angenommen wird. Daß Nicotin, dessen sekretionssteigernde Wirkung zweifellos nervösen Ursprungs ist (primäre Erregung der vegetativen Synapsen), auf die nervösen Einflüssen so gut wie entrückte Gallensekretion ohne Einfluß sein dürfte, war vorauszusehen. In der Tat erwies es sich nach der Einführung der verhältnismäßig großen Dosis von 3 mg in das Duodenum als wirkungslos, womit gleichzeitig auch eine direkte Wirkung auf die Leberzellen ausgeschlossen werden kann. *Adachi* (l. c.) sah eine Hemmung nach 10 mg subkutan, nach kleineren Gaben eine anfängliche Steigerung mit späterer Verlangsamung, doch sind seine Versuche an Hunden mit Dauerfistel ausgeführt. Die Beziehungen des Coffeins zur Verdauung, über die in der Literatur bereits einiges bekannt ist, sollen hier nicht näher erörtert werden. Die geringfügige, wenn auch einwandfreie, über das Maß der normalen Schwankungen hinausgehende Sekretionsbeschleunigung, die gewichtsmäßig nur in einer Periode von 15 Minuten ausgesprochen und auch da nur, zufolge Beobachtung der

---

[1]) *Stary*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 1925.

[2]) Es liegt nahe, aus der Wirkungslosigkeit dieser Gewürze auf die Lebersekretion eine ebensolche auf die anderer Verdauungsdrüsen, mit vielleicht alleiniger Ausnahme der Speicheldrüsen des Mundes, zu erschließen. Da nach *Stary* eine *direkte* Motilitätsbeeinflussung des Darms durch Paprika unwahrscheinlich ist, so bleibt die Bedeutung dieses und ähnlicher Gewürze vorläufig unklar.

Tropfenzahl wenige Minuten dauernd, in einem einzigen mit intravenös gegebenem Coffein ausgeführten Versuch beobachtet wurde, dem zwei negative Versuche gegenüberstehen, halte ich nicht für ausreichend, um dem Coffein eine Wirkung auf die Gallenbereitung zuzuschreiben. *Brugsch* und *Horsters* sahen beim Dauerfistelhunde nach 1 g Coffein per os eine starke Abnahme der Sekretion, gleichzeitig mit heftigen Krämpfen und Speichelfluß. Abgesehen von dem Einwand der angewandten Methodik müssen schon die beschriebenen allgemeinen Vergiftungssymptome davon abhalten, einen Schluß auf eine Sekretionswirkung therapeutischer Dosen von Coffein zu ziehen.

Zusammenfassend muß ich den Schluß ziehen, daß weder den Gewürzen (Paprika, Pfeffer, Zwiebel usw.), noch dem Coffein und Nicotin, noch auch den reinen Nahrungsstoffen (Kohlehydraten, Eiweiß und wahrscheinlich auch Fetten) eine insbesondere fördernde Wirkung auf die Gallensekretion zukommt. Die nach Fleischnahrung oder Injektion von Albumosen in das Duodenum auch von mir beobachtete Sekretionsbeschleunigung ist höchstwahrscheinlich nicht durch die Albumosen selbst, sondern durch die ihnen beigemengten Sekretine bedingt, welche mit den Produkten der Eiweißhydrolyse direkt nichts zu tun haben. Solche Sekretine scheinen ungemein verbreitet und wahrscheinlich in jeder Speise enthalten zu sein. Daß die pflanzlichen Nahrungsmittel, insbesondere die grünen Gemüse, als Sekretinquellen wesentlich in Betracht kommen, ist durch *Bickel* und seine Mitarbeiter ermittelt worden. Wie bereits ausgeführt, wirken die Sekretine auch bei Applikation in den Magen fördernd auf die Magensaftsekretion. Die von *Pawlow* studierte Wirkung der Nahrungsmittel auf die Sekretion der verschiedenen Verdauungsdrüsen ist in dem Anteil, der nicht psychisch bedingt ist, wahrscheinlich ausschließlich durch die in allen Nahrungsmitteln und Speisen enthaltenen Sekretine bedingt. Hierbei kann man nicht unberücksichtigt lassen, daß bei der Bereitung der Speisen Prozeduren vorgenommen werden, welche das Entstehen von Sekretinen aus unwirksamen Vorstufen ermöglichen. Demgegenüber haben die Gewürze jedenfalls nicht die Bedeutung einer Förderung der Sekretion von Verdauungssäften, wenn man aus der Wirkungslosigkeit auf die Gallensekretion auf ähnliche Verhältnisse von Magen und Pankreas schließen darf, was mir nicht unberechtigt erscheint, angesichts des Parallelismus zwischen den unmittelbar, ohne Vermittlung der Nerven wirkenden Stoffen auf diese drei Sekretionen. Auch die mit der Nahrungsaufnahme vielfach in Zusammenhang gebrachten Genußmittel (Coffein und Nicotin) sind auf die Gallensekretion ohne Wirkung. Soweit also die Bromatik (*Paul*) von Gewürzen und Genußmitteln Gebrauch macht, liegt deren Bedeutung auf einem anderen Gebiete, jedenfalls nicht auf dem der unmittelbaren Erregung der Verdauungsdrüsen. Damit muß nun allerdings nicht gesagt sein, daß sie nur als Kontrast- und Geschmacksmittel über das Großhirn wirksam wären, es könnte bei jenen wenigstens, von denen *Stary* nachgewiesen hat, daß sie Wärme perzipierende Nervenendigungen erregen, eine, allerdings vorläufig nicht nachgewiesene, reflektorische Beeinflussung des Magen-Darmkanals vorliegen, die aber nicht zu einer Änderung des Chemismus der Verdauung führen würde, sondern auf dem Gebiete der Motilität zu suchen wäre.

Anschließend seien einige Worte über die Wirkung der Galle selbst gesagt: Ich habe in zahlreichen Fällen Eigengalle der Versuchstiere gereinigte Ochsengalle und verschiedene gallensaure Salze, untersucht und bis

auf sehr seltene Ausnahmen, die schon in der vorhergegangenen Mitteilung erwähnt worden sind[1]), stets eine prompte Wirkung gesehen. Besonders das von *Neubauer* empfohlene Natriumsalz der Dehydrocholsäure erwies sich als stark wirksam. Während von allen früheren Untersuchern die Galle und die gallensauren Salze auf parenteralem Wege gereicht wurden, ausgenommen den bereits wiederholt zitierten *Rutherford*, habe ich vielfach auch die Wirkung intraduodenal eingegebener Zusatzgalle und der Cholate studiert. Auch auf diesem Wege wirken Galle und Cholate stark galletreibend, was ich, die grundlegenden Experimente *Schiffs*[2]) bestätigend, nicht unerwähnt lassen will. In dieser Wirkung liegt die Begründung nicht nur für die Berechtigung, sondern geradezu für die Notwendigkeit der empfohlenen Modifikation der Methodik: Reinjektion der in kleinen Perioden aufgefangenen Galle in den Darm. Daß nicht nur Überschußgalle, sondern auch die normal sezernierte Galle, in den Darm gebracht, fördernd wirkt, ist bereits einleitend erörtert worden. Die Galle hat also auf dem Wege der normalen Zirkulation zum Darm und wieder zurück vom Darm zur Leber auch die Bedeutung eines physiologischen Stimulans, eines *Eigenhormons*, dessen Fehlen bei der Methode der chronischen Fistel das physiologische Geschehen nicht zum Vorteil der Sicherheit der Versuchsergebnisse beeinträchtigt und schließlich zum völligen Versiegen der Gallenproduktion führen kann. Jedenfalls bietet die Wirkung der enteralen Reinjektion (Resorption) der sezernierten Galle, wie bereits seinerzeit ausgeführt, die Möglichkeit einer Verstärkung bzw. Verlängerung der Wirkung cholagoger Stoffe, einschließlich der physiologischen Cholagoga (Sekretine). Auf welche Weise es unter diesen Bedingungen überhaupt dazu kommt, daß eine cholagoge Wirkung aufhört, oft genug überdauert sie die Versuchszeit, so daß sie am Ende des Versuchs noch nicht abgeklungen ist, das zu erklären, reichen die Kenntnisse vorläufig noch nicht aus, da über das Schicksal der Gallensäuren, welche die hier wirksamen Bestandteile der Galle darstellen (*Schiff*), nur bekannt ist, daß sie normalerweise nicht in den Fäzes erscheinen. Es besteht daher keine Unterlage dafür, das Abklingen einer Sekretionssteigerung darauf zurückzuführen, daß ein Teil der sezernierten Galle jeweils der Rückresorption entgeht.

2. *Alkali- und Erdalkalisalze organischer und anorganischer Säuren, Mineralwässer und Quellprodukte. (Tabelle II.)*

Ich führe diese Gruppe hier nur der Vollständigkeit wegen an. Über die Wirkung der betreffenden Stoffe ist bereits l. c. ausführlich berichtet worden. Es soll hier nur noch einmal hervorgehoben werden, daß lediglich die Sulfate von allen untersuchten Salzen als wirksam im Sinne einer Sekretionsvermehrung befunden wurden, aber auch die nur in sehr starken Konzentrationen (die absolute Menge schien belanglos). In jenen Konzentrationen, wie sie in natürlichen Mineralwässern (Karlsbader) vorliegen, und auch noch wesentlich höheren erwiesen sie sich als wirkungslos. Das Karlsbader Mineralwasser ruft eine deutliche, lang andauernde Sekretionssteigerung hervor, welche mit einer Vergrößerung der Gallenkonzentration

---

[1]) Diese Ausnahmen wurden stets als etwas derart Abnormes angesehen, daß Versuche an diesen Tieren als nicht beweisend ausgeschaltet wurden.

[2]) *Schiff*, Pflügers Arch. f. Physiol. **8**, 598, 1870.

Tabelle II.

Substanz	Dosis, Applikationsart, Zahl der Versuche	Wirkung auf Menge	Wirkung auf Konzentration	Bemerkungen
Karlsbader Mineralwasser *)	20—30 ccm iv (4 V)	Vermehrung	Vermehrung	in 4 von 6 Versuchen
	40—60 „ id (6)	„	„	
Karlsbader Sprudelsalz	0,68 proz. Lsg. 40 ccm id (1 V)	keine	keine	
	2,0 „ „ 40 „ id (2 V)	Vermehrung	nicht untersucht	
Künstliches Karlsbader Salz	2,0 „ „ 40 „ id (1 V)	geringere Vermehrung	„ „	
Natrium sulfuricum siccum *)	erst bei 40 ccm 5 proz. Lsg. id	Vermehrung	Vermehrung	

*) Aus der vorangegangenen Mitteilung (*Stransky*, l. c.) übernommen. Dort auch die durchwegs negativen Versuche mit anderen Salzen verschiedener anorganischer und organischer Anionen.

Tabelle III.

Substanz	Dosis, Applikationsart, Zahl der Versuche	Wirkung auf Menge	Wirkung auf Konzentration	Bemerkungen
Äthylalkohol	10 proz. Lsg. 10 ccm id (2 V)	Verminderung	Verminderung	
Amylalkohol	10 „ „ 5 „ id (1 V)	„	„	
Methylalkohol	10 „ „ 10 „ id (1 V)	keine	keine	
	10 „ „ 30 „ id (1 V)	Verminderung	Verminderung	
Chloroform	10 ccm Aqua chloroformiata id (1 V)	„	„	
	Inhalationsnarkose (1 V)	„	„	6 Minuten lang
Äther	0,5 ccm id (1 V)	„	„	
	Inhalationsnarkose (1 V)	„	„	15 Minuten lang
Urethan	subkutan und iv 1,2 g pro Kilo (zahlr. V)	keine	keine	
	10 ccm 10 proz. Lsg. id (1 V)	„	„	b. urethan-narkotisierten Tiere
	20 „ 10 „ „ id (1 V)	„	„	am nicht narkotisierten Tiere

verknüpft ist. Die Hypotonie des Mineralwassers ist für seine Wirkung belanglos. Die Galle enthält normalerweise geringe Mengen von Sulfaten, welche nach intravenöser und intraduodenaler Zufuhr von Sulfaten oder des Mineralwassers nicht vermehrt werden. Ich habe den Schluß gezogen, daß die cholagoge Wirkung des Karlsbader Mineralwassers eine durch die spezifischen Mischungsverhältnisse seiner Ionen modifizierte, verstärkte Sulfatwirkung ist. Es wurde nur das genannte Mineralwasser untersucht. Ähnlich scheint sich das Karlsbader „Sprudelsalz“ zu verhalten: es ist deutlich wirksam, wenn auch schwächer als das Mineralwasser. Ein auf Grund der Analysen selbst hergestelltes Salzgemenge wirkt zwar auch, aber anscheinend schwächer, als das natürliche Salz, während ein käufliches „künstliches Karlsbader Salz“ nur die Wirkung der reinen Sulfate hatte.

Ob andere Sulfatwässer auch eine sekretionsfördernde Wirkung haben, kann a priori aus der Tatsache der Wirksamkeit von Sulfaten nicht geschlossen werden, es erfordert zur Entscheidung dieser Frage jedes einzelne Mineralwasser, wie nicht minder die Quellprodukte, eine spezielle experimentelle Untersuchung. Mit Rücksicht auf die Wichtigkeit, die diesem Gegenstande hinsichtlich der Bewertung, namentlich auch der Quellprodukte, zukommt, soll es bei den hier kurz referierten Versuchen nicht sein Bewenden finden, sondern dieses Problem zum Gegenstande einer besonderen Untersuchung gemacht werden.

3. Narkotica der Alkoholreihe. (Tabelle III.)

Bezüglich des Äthylalkohols, der schon vielfach untersucht worden ist, lauten die Angaben in der Literatur einstimmig dahin, daß er die Lebersekretion hemmt. Die viel stärkere Wirkung des Amylalkohols, der bisher noch nicht untersucht wurde und bei dem auch die oben erwähnte gelbe Verfärbung der Galle beobachtet wurde, scheint die vielfach vertretene Ansicht von einer besonders großen Schädlichkeit der Fuselöle für die Leber (Cirrhose) zu stützen. Unter Berücksichtigung dessen, daß die Glieder dieser pharmakologischen Reihe allgemeine Protoplasmagifte sind, war es sehr wahrscheinlich, daß sie alle auch die Lebertätigkeit hemmen werden, und gerade die unter ihnen am meisten, denen auch sonst eine größere Toxicität eignet, das sind die halogenisierten und insbesondere chlorierten. In der Tat erwiesen sich alle Glieder der Alkoholreihe als hemmend, wobei die relative Harmlosigkeit des Äthers gegenüber dem Chloroform zutage trat. Die große Intensität der Chloroformwirkung steht durchaus in Übereinstimmung mit den Ergebnissen morphologischer und chemischer Untersuchungen von *Whipple* (l. c.), aus denen geradezu hervorzugehen scheint, daß die Leber gegenüber dem Chloroform besonders empfindlich ist. Mengen, die zu einer Narkose weitaus nicht ausreichen, erwiesen sich in seinen Versuchen bereits als hepatotoxisch. Die größere Empfindlichkeit des Zentralnervensystems gegen die Glieder dieser Substanzengruppe, welche für ihre Brauchbarkeit als Inhalationsanästhetica und Schlafmittel maßgebend ist, dürfte demnach nur eine scheinbare sein. Tatsächlich sind die Leberzellen mindestens ebenso empfindlich, aber ihre Läsion ruft keine auffallenden akuten Erscheinungen hervor. Bei der Inhalation von Chloroform äußert sich diese starke Hemmung womöglich noch sinnfälliger, als bei der intraduodenalen Applikation, wiewohl das Gegenteil zu erwarten gewesen wäre. Die Narkose wurde mit einem annähernd definierten Gemisch von Chloroformdampf in Luft vorgenommen, welches sich in einer 16 Liter fassenden

Flasche befand, aus der und in die das Tier atmete, wobei In- und Exspiration durch mit starker Lauge beschickte *Müller*sche Flüssigkeitsventile getrennt waren. Unter Verwendung einer dicht schließenden Atemmaske erfolgte die Inspiration aus einem kurzen, die Exspiration in ein langes, bis zum Boden der Flasche reichendes Glasrohr. Die Flasche war mit Stangenkali zur weiteren Absorption des exhalierten Kohlendioxyds beschickt. In die Flasche wurden 0,8 ccm Chloroform pro narcosi eingetropft und durch Rollen der Flasche für rasche Verdampfung gesorgt. Unter Berücksichtigung des spezifischen Gewichts des Chloroforms und der Gaskonstante ergibt sich eine Konzentration von rund 1 Vol.-Proz. Chloroform-(Dampf), welche das Kaninchen bei einer für kurze Zeit ausreichenden Sauerstoffversorgung (3,2 Liter) atmete. Bei Anwendung dieser Anordnung, welche sich bei uns zu Vorlesungsversuchen bestens bewährt hat, verfallen Kaninchen erfahrungsgemäß nach 5 bis 6 Minuten in eine wenn auch nicht ganz reflexlose Narkose, welche ohne Gefahr eine halbe Stunde aufrechterhalten werden kann. Das wie gewöhnlich mit Urethan narkotisierte Tier atmete von Beginn des Versuchs an durch die Apparatur ohne Chloroformflasche, welche sodann, nach Feststellung der Normalsekretion in mehreren Perioden, für 6 Minuten eingeschaltet wurde. Der Effekt war eine die Einatmungszeit stundenlang überdauernde beträchtliche Senkung der Sekretionsgeschwindigkeit der Galle, welche sich erst auf intravenöse Zufuhr von 20 ccm Karlsbader Mineralwasser wieder erholte, ohne aber die normale Höhe zu erreichen. Es ergibt sich, daß die Leber, wie man das schon aus *Whipples* Versuchen erschließen konnte, gegen das Chloroform zumindest ebenso empfindlich ist wie das Zentralnervensystem, ja es scheint wahrscheinlich, daß geringere als die narkotisierenden Konzentrationen bereits einen Einfluß auf die Gallensekretion haben werden. Die lange Dauer der Sekretionsminderung durch Chloroform bietet die Möglichkeit, den Einfluß von Pharmacis auf eine *geschädigte* Leberfunktion zu prüfen und hierbei vielleicht noch Stoffe aufzufinden, welche bisher als wirkungslos befunden worden sind. Doch soll dies zum Gegenstand einer besonderen Untersuchung gemacht werden.

Die Einatmung von Äther in einer Konzentration von etwa 3 Vol.-Proz. Ätherdampf in Luft mit der gleichen Versuchsanordnung ergab ebenfalls eine Senkung der Sekretionsgeschwindigkeit, doch war diese viel geringer und überdauerte die Zeit der Einatmung (15 Minuten) nicht wesentlich. Es scheint daher der Äther im Gegensatz zum Chloroform bloß eine richtige, reversible Narkose ohne Dauerschädigung der Leber zu bewirken, welche auch dem Äther gegenüber die gleiche Empfindlichkeit hat, wie das Zentralnervensystem.

Bei dieser Sachlage erfordert die Anwendung der Narkose als methodisch kaum entbehrliches Hilfsmittel bei Leberversuchen, insbesondere bei meiner Methodik, die allergrößte Aufmerksamkeit. Ich habe daher die Beeinflussung der Gallensekretion durch das von mir zur Narkose stets verwendete Urethan in zahlreichen Versuchen geprüft und stets seine völlige Indifferenz feststellen können. Besonders beweisend erscheint mir ein Versuch, bei dem Urethan einem bereits durch subkutane Urethaninjektion narkotisierten Kaninchen intraduodenal gereicht, keinerlei Wirkung erkennen ließ, während die folgende Kontrollinjektion von Cholaten prompt wirkte. Auch die Größe der oben mitgeteilte, aus meinen Versuchen berechnete Sekretionsgeschwindigkeit des normalen Kaninchens, von den exzessiv hohen Werten ganz zu schweigen, spricht für die Indifferenz des Urethans auf die Lebersekretion.

Es wäre gewiß von Vorteil gewesen, auch noch andere Glieder dieser Substanzengruppe zu studieren, doch liegt eine solche Untersuchung eher auf dem Gebiete der Pharmakologie der Narkotica, als auf dem der Gallensekretion. Es soll aber nicht ungesagt bleiben, daß sich hier ein Weg bietet, objektiv die größere oder kleinere Schädlichkeit insbesondere der so viel gebrauchten Schlafmittel experimentell zu beurteilen. Das Urethan gilt auch sonst als ein mildes Schlafmittel, und diese wenigstens in meinen Versuchen sich direkt als Ausnahme vordrängende Harmlosigkeit des Urethans scheint darauf hinzudeuten, daß die allgemeine Protoplasmawirkung dieser Stoffe Empfindlichkeitsunterschiede der verschiedenen Organe verschiedenen Substanzen dieser Reihe gegenüber zuließe. Eine von Substanz zu Substanz anders abgestufte Empfindlichkeitsreihe der Organe kann daher wohl angenommen werden. Bei dem nahezu vollständigen Mangel irgend einer experimentellen Beurteilungsmöglichkeit des relativen Wertes der einzelnen Schlafmittel ist es sehr wohl denkbar, daß ihre Prüfung an der Lebersekretion eine Grundlage für eine rationelle Auswahl geben könnte.

Außer den erwähnten Substanzen habe ich auch noch den Methylalkohol untersucht, welcher als Anfangsglied dieser Reihe in manchen Beziehungen ein abweichendes Verhalten von den übrigen Gliedern aufweist. Hinsichtlich seiner Leberwirkung ist er zweifellos weniger wirksam als der Äthylalkohol. Vergleicht man molare Konzentrationen, so tritt diese Minderwirksamkeit noch deutlicher hervor: 10 ccm einer 10proz. wässerigen Lösung = 31 Millimol waren wirkungslos, erst nach 30 ccm dieser Lösung = 93 Millimol sah ich eine Hemmung der Sekretion, welche ungefähr der entspricht, welche 10 ccm eines 10proz. Äthylalkohols = 21,7 Millimol hervorgerufen haben. Beide wurden intraduodenal gereicht. Unter die Teilwirkungen, aus denen sich die besondere Giftigkeit des Holzgeistes gegenüber dem Weingeist ergibt, fällt jedenfalls nicht eine besondere Leberwirkung, sondern diese muß gegenüber den anderen Teilwirkungen völlig in den Hintergrund treten.

Bei allen erwähnten Versuchen sank mit der Gallenmenge auch ihre Konzentration. Auf dieses Parallelgehen zwischen Konzentration und Menge habe ich bereits als einer charakteristischen Eigenschaft der Gallensekretion, wahrscheinlich aller Sekretionen (im Gegensatz zu der Harnabsonderung), hingewiesen. Wohl die meisten Autoren, welche sich mit eingehenderen Studien über die Lebersekretion beschäftigt haben, sahen, wie aus ihren Protokollen hervorgeht, dieses Phänomen, ohne es aber hervorzuheben und ihm die, wie ich glaube, große Bedeutung beizumessen, die es verdient.

4. *Ätherische Öle.* *(Tabelle IV.)*

Die Untersuchung dieser Substanzengruppe erschien besonders angebracht, da ein großer Teil der so zahlreichen und vielfach verwendeten Geheimmittel gegen Gallenleiden und Gallensteinkoliken aus einem Gemenge von Kräutern besteht, „Gallentee", welche reich an verschiedenen ätherischen Ölen sind und außer diesen keine sonst irgendwie pharmakologisch in Betracht kommenden Substanzen enthalten. Auch sind ätherische Öle in verschiedenen Spezialpräparaten, welche zur Behandlung von Leberleiden und Koliken empfohlen werden, enthalten.

Tabelle IV.

Substanz	Dosis, Applikationsart, Zahl der Versuche	Wirkung auf	
		Menge	Konzentration
Menthol . .	gesättigte Tyrodelösung 5 ccm id (1 V)	Vermehrung	Vermehrung
Anethol . .	gesättigte Tyrodelösung 10 ccm id (1 V)	,,	,,
Cineol . . .	gesättigte Tyrodelösung 30 ccm id (1 V)	,,	,,
Campher .	gesättigte Tyrodelösung 30 ccm id (1 V)	,,	schwache Vermehrung
	gesättigte Tyrodelösung 20 ccm id (1 V)	,,	Vermehrung
	0,2 g Champhora trita suspendiert id (1 V)	Verminderung	keine

Experimentelle Beobachtungen über die Wirkung des Camphers und verschiedener anderer ätherischer Öle, welche im hiesigen Institut angestellt worden waren [*Wiechowski*[1], *Stross*[2]] hatten ergeben, daß diesen Substanzen eine lähmende Wirkung auf die glatte Muskulatur zukommt, insbesondere aber, daß sie spastisch kontrahierte glatte Muskeln zur Erschlaffung zu bringen vermögen, und zwar direkt, ohne Vermittlung der Innervation. Sehr instruktiv waren in dieser Beziehung Versuche an der überlebenden Gallenblase verschiedener Tiere nach der Methode von *Magnus* (s. *Stross*). Die verschiedenen geprüften ätherischen Öle verhielten sich hierbei quantitativ nicht gleich wirksam, besonders stark hat Campher und Menthol gelähmt. Bei dieser Sachlage war es sehr wahrscheinlich, daß die lähmende Eigenschaft der ätherischen Öle sich auch bei ihrer therapeutischen Anwendung äußert und für ihre Heilwirkung verantwortlich zu machen ist. Auf Grund dieser experimentellen Befunde wurde die Anregung gegeben, bei der Gallensteinkolik Campher in alkoholischer Lösung per os zu reichen. Aus den Berichten hiesiger Kliniken über den Erfolg einer solchen Medikation geht hervor, daß man dieser Substanzengruppe nicht jede therapeutische Wirksamkeit absprechen kann, im Gegenteil, es gelingt vielfach, durch Campherdarreichung den Gallensteinanfall zu kupieren. Zweifellos ist dieser therapeutische Effekt der Wirkung auf die mit glatter Muskulatur ausgestatteten Gallenwege zuzuschreiben.

Um so interessanter war es, festzustellen, ob den ätherischen Ölen neben dieser Wirkung auch eine solche auf die *Gallenbereitung* zukommt. Ich habe daher vorzugsweise jene ätherischen Öle geprüft, deren Wirkung auf die Motilität von Darm und Gallenblase bereits ermittelt war: Campher, Menthol, Anethol, Cineol. Gerade diese (ausgenommen der Campher) sind es auch, deren Stammdrogen in erster Linie Bestandteile der verschiedenen „Gallentees" sind. Die beobachtete Wirkung ist eine, wenn auch nicht hervorragende und langdauernde, doch einwandfrei festgestellte Förderung der Gallensekretion. Die Mengen, welche diese Wirkung hervorriefen, sind geringfügig in Anbetracht der geringen Wasserlöslichkeit dieser Stoffe

[1]) *Wiechowski*, Verh. d. waffenbrüderl. Vereinigung. Baden bei Wien, 1917.

[2]) *Stross*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **95**, 304, 1922.

und des Umstandes, daß gesättigte wässerige Lösungen intraduodenal zur Anwendung kamen. Nur beim Campher habe ich auch die Wirkung abnorm großer Mengen, wie sie therapeutisch kaum in Betracht kommen, untersucht, indem ich eine Suspension von Camphora trita in physiologischer Salzlösung intraduodenal reichte. Während der Campher in gesättigter wässeriger Lösung ebenso wirkte wie die anderen ätherischen Öle, sah ich nach der Einführung der Suspension eine deutliche Hemmung des Gallenflusses eintreten.

Die Förderung der Gallensekretion durch ätherische Öle ist ein interessanter Befund im Hinblick darauf, daß sie auch in kleinsten Dosen an der glatten Muskulatur ausschießlich lähmend wirken, und daß sie befähigt sind, auch Nervenendigungen ohne vorausgehende Erregung zu lähmen [Herzvagus beim Frosche[1])], wobei jedoch bemerkt sei, daß die Lähmung der glatten Muskulatur durch direkte Wirkung zustande kommt. Als Analogon zu der beobachteten erregenden Wirkung auf die Gallensekretion, die wohl auch direkt, ohne Nervenvermittlung, an der Drüsenzelle angreift, kann herangezogen werden, daß unter den ätherischen Ölen wenigstens dem Campher eine erregende Wirkung auf das Großhirn zukommt, welche nicht nur zu einer Wiederbelebung des daniederliegenden Sensoriums (analeptische Campherwirkung), sondern auch zu typischen Großhirnkrämpfen führt. Daß diese Erregung eine reale und keine Pseudoerregung, etwa durch Enthemmung sein dürfte, haben im hiesigen Institut ausgeführte Untersuchungen über die Wirkung des Camphers auf höhere Zentren dargetan, welche, mit psychometrischen Methoden angestellt, ergeben haben, daß der Campher zwar keine ausgesprochen fördernde Wirkung vom Typus des Coffeins hervorzurufen vermag, daß ihm aber auch keinesfalls die lähmende Wirkung des Alkohols zukommt [*Stross*[2])]. Von den ätherischen Ölen ist in dieser Richtung nur der Campher untersucht.

Mit der obigen Feststellung, daß allen untersuchten Vertretern dieser Substanzengruppe die gleiche fördernde Wirkung auf die Gallenproduktion zukommt, ist ein weiterer Beleg dafür erbracht, daß es berechtigt ist, die ätherischen Öle trotz ihrer sehr verschiedenen chemischen Konstitution zu einer pharmakologischen Gruppe zu vereinigen, ähnlich wie die aus chemisch ebenfalls heterogenen Elementen sich zusammensetzende Gruppe der Narkotica der Alkoholreihe[3]).

Ob diese nicht sehr erhebliche und kurzdauernde Wirkung auf die Sekretion, insbesondere neben der viel ausgiebigeren antispatischen Wirkung, eine therapeutische Bedeutung namentlich im Kolikanfall hat, ist fraglich, immerhin aber nicht ohne weiteres zu verneinen.

In allen ausgeführten Versuchen mit dieser Substanzengruppe konnte die Beobachtung gemacht werden, daß die nach der intraduodenalen In-

---

[1]) *Stross*, l. c.

[2]) *Stross*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **104**, 323, 1924.

[3]) Es drängte sich hier die Frage auf, ob auch andere Sekretionen die Beeinflußbarkeit durch ätherische Öle aufweisen wie die Leber, bei voller Würdigung der Tatsache, daß die meisten anderen Drüsen durch das vegetative Nervensystem weit mehr kontrolliert werden. Aber nicht nur die Beeinflussung der Drüsen im engeren Sinne, sondern auch eine solche der Nierensekretion durch ätherische Öle gewinnt erneutes Interesse, namentlich wenn man bedenkt, daß die ärztliche Erfahrung einigen von

jektion sezernierte Galle durch längere Zeit deutlich nach den verwendeten ätherischen Ölen roch. Sie werden also wenigstens zum Teil mit der Galle ausgeschieden und machen deren Kreislauf mit. Dieser Umstand ist der Intensität und Dauer der Wirkungen auf Sekretion und Motilität gewiß förderlich, werden doch dadurch Leber und Gallenwege durch längere Zeit einer Konzentration an ätherischen Ölen ausgesetzt, welche zweifellos viel höher liegt, als sie bei gleichmäßiger Verteilung nach der Resorption in die Blutbahn sein könnte. Ein anderer Nachweis als der mit der Nase ist bei allen ätherischen Ölen und den sehr kleinen Mengen, die hier in Frage kommen, wohl ausgeschlossen. Ist doch sogar auch für den Campher, nicht einmal in gesättigten wässerigen Lösungen, die sonst nichts anderes enthalten, eine brauchbare quantitative Bestimmungsmethode bisher noch nicht gelungen. Ich habe diesem Punkte daher auch keine weiteren Bemühungen zugewendet.

Wenn auch die Bedeutung der Sekretionswirkung in therapeutischer Hinsicht eine zweifelhafte ist und gegenüber der Muskelwirkung stark in den Hintergrund tritt, so ist sie doch möglicherweise für die diätetische Bedeutung gewisser Gewürze in Betracht zu ziehen, welche hiernach, den Sekretinen prinzipiell gleich wirksam, die Produktion der Verdauungssäfte fördern können (Kümmel, Fenchel, Anis, Gewürznelken, Muskatnuß, Kappern usw.).

Vielfach wird den ätherischen Ölen eine lokal reizende, hyperämisierende Wirkung zugeschrieben. Wenn eine solche auch für die kleinen Dosen, die bei meinen Versuchen gereicht wurden, gelten sollte, so ist jedenfalls diese Teilwirkung an der Sekretionswirkung der Leber nicht beteiligt, denn, wie bereits erwähnt, ist Hyperämie der Darmschleimhaut an sich ohne Einfluß auf die Gallensekretion.

Daß der Campher in jenen Versuchen, in denen ich ihn in größeren Mengen in Suspension in das Duodenum einspritzte, nicht förderte, sondern sofort lähmte, kam nicht unerwartet. Denn schon in den ersten Mitteilungen über die Campherwirkung aus dem hiesigen Institut wurde auf die Analogie der physikalischen bzw. Löslichkeitsverhältnisse zwischen ätherischen Ölen und den Narkoticis der Alkoholreihe hingewiesen (Lipoidlöslichkeit, Teilungskoeffizient Öl—Wasser). Die prinzipiell lähmende Wirkung der ätherischen Öle hat sich als eine ähnliche Protoplasmawirkung, der jede Zelle erliegt, erwiesen, wie die der Alkoholnarkotica und die zweifellos

---

ihnen eine diuretische Wirkung zuschreibt (Oleum Juniperi, Oleum Petroselini). Daneben dürften aber die bisher so wenig untersuchten kleinen Drüsen des Respirationstraktus (gewisse Expektorantien) und Digestionstraktus nicht übersehen werden. Ich habe daher versucht, wenigstens in einigen orientierenden Experimenten etwas über die Wirkung der ätherischen Öle auf die Mundspeichelsekretion der Katze zu erfahren. Die vorläufigen Ergebnisse dieser Versuche, die mit einer hier nicht näher zu erörternden Methode an Katzen ausgeführt wurden, sprechen dafür, daß wenigstens dem Campher eine wenn auch schwache fördernde Wirkung eigen ist. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß die sekretionsfördernde Wirkung der ätherischen Öle nicht auf die Leber allein beschränkt ist, eine Wirkung, welche, wie oben ausgeführt, als eine direkt die Drüsenzellen treffende aufzufassen ist. Damit schließen sich die ätherischen Öle in dieser Hinsicht den Sekretinen an, welche ebenfalls direkt angreifen (Wirksamkeit trotz Atropin) und alle Drüsen treffen.

vorhandene zentrale Erregung des Camphers, zu der nun auch die Steigerung der Gallensekretion kommt, mußte als eine Ausnahme bzw. als ein auffälliges Abweichen von dem allgemeinen Wirkungstypus angesehen werden. Diese Abweichung äußert sich an der Leber ganz deutlich in dem gegensätzlichen Verhalten von Alkohol sowie seiner pharmakologischen Homologen und kleinen Gaben von Campher sowie anderer ätherischer Öle. Wir konnten aber feststellen, daß dieser zentralen anfänglichen Erregung des Camphers vielleicht gleichzeitig, jedenfalls aber später bzw. bei größeren Dosen eine als zentrale Großhirnnarkose erkannte lähmende Wirkung des Zentralnervensystems folgt. Bei anderen ätherischen Ölen ist diese ausschließlich vorhanden, ohne den so auffallenden positiven Vorschlag der Campherwirkung, der wie ein besonders ausgeprägtes Exzitationsstadium gedeutet werden kann. Bei den Campherversuchen mit großen Dosen kommt also die den Alkoholnarkoticis zukommende hemmende Wirkung auf die Gallensekretion zum Vorschein, ein weiterer Beitrag für die Berechtigung unserer Anschauung von der Elementarwirkung der ätherischen Öle.

Hinsichtlich des Konzentrationsverlaufs bei den Versuchen mit dieser Substanzengruppe konnte immer nur das auch sonst beobachtete und eingangs ausführlich erwähnte, geradezu gesetzmäßige Parallelgehen mit der Sekretionsmenge beobachtet werden. Also auch hier konnte keine Substanz gefunden werden, welche eine Verdünnung der sezernierten Galle bewirkt hätte.

Pohl fand das Menthol an sich als wirkungslos und auch ohne Einfluß auf die Wirksamkeit gallensaurer Salze[1]), *Specht* sah beim Hunde vom Pfefferminzöl eine schwache, unsichere Förderung der Gallensekretion. In der älteren Literatur wurde das Menthol zumeist als unwirksam beim Hunde befunden.

5. Die organischen Abführmittel. Entzündliche Reizung der Darmschleimhaut. (Tabelle V).

Die Abführmittel im allgemeinen und die organischen insbesondere spielen in der Therapie der Leberleiden von jeher eine große Rolle. Gesicherte Kenntnisse über ihre Wirksamkeit auf die Gallensekretion besitzen wir jedoch nicht. Wie die Tabelle V zeigt, erwies sich nur das Podophyllin (Podophyllotoxin) als wirksam, und zwar im Sinne einer beträchtlichen Steigerung der Gallensekretion, welche in keinem der angestellten Versuche vermißt wurde. Ich befinde mich hinsichtlich dieser Beobachtung in Übereinstimmung mit den Befunden *Rutherfords* am Hunde mit akuter Fistel. Ebenso wie seine zahlreichen anderen zutreffenden Versuchsergebnisse ist auch dieses anscheinend ganz in Vergessenheit geraten, so daß in unseren besten Lehrbüchern das Podophyllin zwar als praktisch angewandtes Cholagogum angeführt ist, über eine experimentell nachweisbare Wirkung jedoch nichts berichtet wird. Ich injizierte das in der bei uns noch in Geltung befindlichen Pharmakopoea austriaca VIII enthaltene Präparat Resina Podophylli, welches durch Ausfällen des alkoholischen Auszuges der

[1]) Die negativen Ergebnisse *Pohls* sind sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß er das Menthol in (gesättigter) wässeriger Lösung intravenös gegeben hat und daher, entsprechend den oben gemachten Ausführungen, die in der Zeiteinheit in der Leber vorhandene Mentholmenge weitaus geringer war als bei intraduodenaler Applikation.

Tabelle V.

Substanz	Dosis, Applikationsart, Zahl der Versuche	Wirkung auf		Bemerkungen
		Menge	Konzentration	
Resina Podophylli	0,1 g in 5 ccm id (2 V)	Vermehrung	Vermehrung	
	0,05 g „ 5 „ id (1 V)	„	„	
Gummiresina Gutti	0,1 g Na-Salz der Gambodgasäure id (1 V)	Verminderung	Verminderung	Succus entericus vermehrt
	0,05 g „ „ „ id (1 V)	keine	keine	
Extr. Colocynthidis	1 proz. Lsg. 5 ccm id (1 V)	„	„	
Resina Jalapae .	0,1 g in 6 ccm id (1 V)	Verminderung	Verminderung	Succus entericus vermehrt
Oleum Ricini . .	1 ccm in 8 ccm Wasser emulgiert id (1 V)	keine	keine	
Oleum Crotonis .	1 Tropfen in 5 ccm Wasser emulgiert id (2 V)	Verminderung	nicht untersucht	Succus entericus vermehrt
Kalomel	0,05 g in Wasser suspendiert id (1 V)	keine	keine	
Aloe	0,1 g Glukoside id (1 V)	„	„	
Radix Rhei . . .	1,0 g „ 10 proz. Lsg. id (2 V)	„	„	
Cortex Frangulae	0,1 g „ id (1 V)	„	„	
Oleum Sinapis aether	1 Tropfen in 10 ccm Wasser id (1 V)	Verminderung	Verminderung	Succus entericus vermehrt, starke Injektion der Schleimhaut
Succus recens Raphani . . .	2 ccm id (1 V)	„	„	Succus entericus vermehrt, blutige Imbibition d. Schleimhaut

Wurzel von Podophyllum peltatum mit salzsäurehaltigem Wasser hergestellt wird. Die Substanz gilt als ein Harz, ist aber ein Gemenge verschiedener Stoffe. Ich gab es intraduodenal, ebenso wie die anderen hierher gehörigen Harze (Gutti, Jalapa) in wässerigen Lösungen, welche sich unter Anwendung von Natriumhydrocarbonat leicht herstellen lassen, ohne daß man befürchten muß, eine allzu alkalische Flüssigkeit zu erhalten. Die Wirkung des Podophyllins auf die Gallensekretion gehört zweifellos zu den beim Kaninchen am sichersten zu demonstrierenden und gleicht in ihrem Ausmaß nahezu der durch Galle, Cholate und Karlsbader Wasser hervorgerufenen. Daß diese Wirkung in keinem Zusammenhang mit der Ursache der Abführwirkung des Podophyllins steht, geht daraus hervor, daß alle übrigen untersuchten abführend wirkenden Harze, welche wie das Podophyllin am Dünndarm angreifen sollen[1]) (Koloquinten, Gutti, Jalapa), keine Beeinflussung der Gallensekretion hervorriefen. Auch die am Dünndarm angreifenden abführenden Öle (Ricinus, Croton) waren ohne Einfluß. Der hemmende Einfluß, der von diesen Ölen als Fetten

[1]) *Meyer-Gottlieb*, Lehrbuch der experimentellen Pharmakologie.

erwartet werden konnte (s. oben), ist wohl deshalb hier ausgeblieben, weil die Menge des gereichten Ricinusöls und erst recht 1 Tropfen gereichten Crotonöls nur einen Bruchteil der wirksamen Dosis des Olivenöls betrug oder den hypothetischen Beistoff des letzteren nicht enthalten. Bemerkenswert ist die negative Wirkung des Crotonöls, weil es, wie zu erwarten war, eine deutliche Hyperämie der Darmschleimhaut als Ausdruck seiner reizenden Wirkung hervorgerufen hat und daher mit einbezogen werden kann zu den weiter unten besprochenen Versuchen, welche die eventuelle Wirkung einer entzündlichen Reizung der Dünndarmschleimhaut auf die Gallensekretion feststellen sollten.

Zu den am Dünndarm durch Motilitätssteigerung wirkenden Laxantien wird auch das Extractum Colocynthidis gezählt bzw. das Glucosid Colocynthin. Seine Wirkung scheint der des Crotonöls verwandt, höhere Dosen machen Hyperämie und Entzündung. Es scheint sich um eine nach der Resorption recht giftige Substanz zu handeln. Ich verwendete eine 1 proz. wässerige Lösung des offizinellen Extractum Colocynthidis zur intraduodenalen Injektion. Die entzündliche Reizung war besonders stark ausgeprägt. Auch Gutti und Jalapa erwiesen sich als wirkungslos. Das Jalapenharz wurde unter Zuhilfenahme von Natriumhydrocarbonat gelöst, vom Gutti verwendete ich eine Natriumseife seines Harzes (Gambodgiasäure), welche nach Abtrennung des Gummis aus der naturellen Droge durch Lösen des Harzes in Soda und Abtrennung des Sodaüberschusses durch Alkohol gewonnen worden war. Bei einigen Versuchen mit diesen Substanzen beobachtete ich eine sonst vermißte geringe Abnahme der Gallenmenge. Ich glaube jedoch nicht, daß hier eine Wirkung auf die Sekretion vorliegt, sondern beziehe sie dann immer auf die bei der nachträglichen Obduktion festgestellte reichliche (entzündliche?) Füllung des Dünndarms mit Flüssigkeit. *Rutherford* hat darauf hingewiesen, daß unter Umständen sonst sicher zu beobachtende Steigerungen der Gallensekretion ausbleiben, wenn eine starke Vermehrung des Succus entericus eintritt.

Es zeigt sich also, daß eine am Dünndarm angreifende Abführwirkung als solche ohne Einfluß auf die Gallensekretion ist. Unter diesen Umständen muß die Wirkung des Podophyllins als etwas durchaus Spezifisches angesehen werden. Der, wie ich glaube, berechtigte Schluß auf die Wirkungslosigkeit der Dünndarmdiarrhöe auf die Gallensekretion läßt ***nicht nur das Podophyllin, sondern auch das Karlsbader Mineralwasser als Stoffe erscheinen, denen neben und unabhängig von einer eventuellen Abführwirkung eine spezifische Erregung der Gallensekretion zukommt.***

Ebenso negativ wie die Versuche mit den genannten Abführmitteln verlief eine Reihe von Versuchen mit solchen Abführmitteln, deren Wirkung auf eine Motilitätsbeeinflussung des Dickdarms zurückgeführt wird. Von diesen Stoffen habe ich nur einige Anthrachinonglucoside untersucht. Schwefel und Phenolphthalein wurden nicht untersucht und die Wirkung der gleichfalls abführenden Gallensäuren[1]) ist bekannt. Die von mir verwendeten Präparate waren mehr oder weniger reine, von ihren Spaltprodukten nahezu freie Glucoside, welche aus den alkoholisch-wässerigen Extrakten der betreffenden Drogen nach einem in unserem Institut aus-

[1]) *Singer* und *Glässner*, Arch. f. Verd.-Kr. 18, 192, 1912.

gebildeten Aussalzverfahren isoliert worden sind[1]). Diese Präparate waren harzfrei und enthielten auch keine Beimengungen von freien Gerbstoffen. Es sind in Wasser und Alkohol klar lösliche, dunkel gefärbte, amorphe Pulver, welche schon in Dezigrammen beim Menschen abführend wirken. Der Wirkungslosigkeit auf die Gallensekretion steht gegenüber ihre bei diesen Versuchen beobachtete Eigenschaft, vom Dünndarm resorbiert und mit der Galle ausgeschieden zu werden. Die Ausscheidung tritt nach der intraduodenalen Einverleibung bald ein und dauert recht lange. Die Galle zeigt bald eine braune Färbung, und es lassen sich in ihr sowohl vor, als nach dem Verseifen durch Kochen mit Lauge freie Emodine mittels der *Bornträger*schen Farbreaktion nachweisen (Ausschütteln der angesäuerten Flüssigkeit mit Benzol und Schütteln des abgetrennten Benzolauszuges mit konzentriertem Ammoniak: starke Rotviolettfärbung des Ammoniaks). Von den Dickdarmlaxantien wird angenommen, daß sie im Dünndarm schwer resorbierbar sind und daher in toto in den Dickdarm gelangen, wo sie als solche eine dem Wesen nach kaum noch erklärte Wirkung auf die Motilität hervorrufen. Obige Versuche lassen diese besonders von den Anthrachinonderivaten angenommene schwere Resorbierbarkeit im Dünndarm jedenfalls beim Kaninchen als zumindest nicht absolut geltend, ja geradezu als problematisch erscheinen. Die Tatsache, daß diese Glucoside im Dünndarm rasch resorbiert werden, in der Galle erscheinen und sich in ihr längere Zeit hindurch nachweisen lassen, läßt die Vermutung als berechtigt erscheinen, daß diese pharmakologische Substanzengruppe nicht ohne therapeutische Bedeutung für die Leber ist. Erfahrungen der letzten Zeit weisen darauf hin, daß den Anthrachinonglucosiden eine lokal antiphlogistische und analgetische Wirkung zukommt[2]), und es wäre nicht ausgeschlossen, daß eine solche bei der Darreichung per os sich an den entzündeten Gallenwegen äußern könnte. Die Bedeutung dieser Stoffe bzw. ihrer Stammdrogen, die in zahlreichen Geheimmitteln und Präparaten gegen das Gallensteinleiden enthalten sind, könnte auf diese Eigenschaften zurückzuführen sein, wenn diesen Stoffen überhaupt eine Heilwirkung zugeschrieben werden kann.

Vom Kalomel ist angegeben[3]), daß es in abführenden Gaben einen hemmenden, sonst überhaupt keinen Einfluß auf die Gallensekretion haben soll. In meinen Versuchen war es wirkungslos und die in der Literatur angegebene Hemmung dürfte sekundär durch jene von *Rutherford* gefundene Tatsache einer Vermehrung der Darmflüssigkeit bedingt sein.

Schließlich seien die in der Tabelle V als letzte angeführten Versuche erwähnt, welche das Ziel hatten, eine Wirkung der entzündlichen Reizung der Dünndarmschleimhaut auf die Gallensekretion zu studieren. Die weitgehende Unabhängigkeit der Gallensekretion von *direkten* Nervenreizen ebenso wie das Fehlen *reflektorischer* Beeinflussung der Gallensekretion (Wärmeerregung durch Paprika und Pfeffer, Motilitätssteigerung durch Laxantien) ließ es kaum erwarten, daß eine *entzündliche* Reizung der Dünndarmschleimhaut auf die Gallenbereitung von Einfluß wäre. Eine Hyperämie des Darmes konnte aber einen kollateralen Afflux der Leber

[1]) *Wiechowski*, Verh. d. deutsch. pharmak. Ges. 1921; Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 1921.

[2]) *Wiechowski-Klausner*, Dermatol. Wochenschr. 78, 18, 1924.

[3]) *Meyer-Gottlieb*, Lehrbuch der experimentellen Pharmakologie.

zur Folge haben, wie er uns heute als Erregungsirradiation im gleichen Rückenmarkssegment in Analogie mit den *Head*schen Zonen[1]) eine geläufige Vorstellung ist. Es findet sich in der Literatur gelegentlich geradezu der Gedanke ausgesprochen, daß auf ähnliche Weise eine Beeinflussung der Lebertätigkeit, ihres Stoffwechsels durch chronische Abführkuren möglich wäre. Die absolute Wirkungslosigkeit einer selbst hochgradigen akuten Entzündungsreizung der Dünndarmschleimhaut mit Hyperämie, Injektion, angedeuteten und manifesten Blutungen und blutigen Imbibitionen auf die Lebersekretion entzieht wohl diesen Deduktionen die Basis. Zur Verwendung kamen neben einer Lösung von Senföl in Wasser auch noch andere Senföl enthaltende Pflanzen (Zwiebelextrakt, Succus recens Raphani), alle ohne einen Effekt auf die Gallensekretion. Dazu gehören auch noch die bereits berichteten Versuche mit Crotonöl und Extractum Colocynthidis, welche ebenfalls Entzündungserscheinungen hervorriefen und als unwirksam auf die Gallensekretion befunden worden sind.

6. *Bitterstoffglucoside. (Tabelle VI.)*

Stoffe dieser Gruppe wurden m. W. hinsichtlich ihres Verhaltens zur Gallensekretion überhaupt noch nicht untersucht, trotzdem viele von ihnen in zahlreichen Mitteln und Präparaten, welche gegen Verdauungsstörungen aller Art verwendet werden, enthalten sind. Auch die Glucoside dieser Gruppe wurden als reine, nach dem bereits erwähnten Aussalzverfahren dargestellte Substanzen in wässeriger Lösung intraduodenal gereicht. Mit Ausnahme einer zweifelhaften, zumindest unsicheren Wirkung der Glucoside von Herba Centaurii minoris erwiesen sich alle Vertreter dieser Gruppe als indifferent gegenüber der Gallensekretion. Bei Verabreichung der Glucoside von Radix Gentianae trat für kurze Zeit eine braune Verfärbung der Galle auf. Eine Untersuchung, ob diese Stoffe wie die Anthrachinonglucoside mit der Galle ausgeschieden werden, ist wegen methodischer Schwierigkeiten unterblieben.

7. *Alkaloide. (Tabelle VII.)*

Zu den in der Tabelle VII angeführten ist das bereits bei den Genußmitteln abgehandelte Nicotin hinzuzunehmen.

Das Strychnin erwies sich so wie das Nicotin als indifferent. Während die Wirkungslosigkeit des Nicotins, dessen Wirkungsgebiet vorzugsweise auf dem Gebiete des vegetativen Nervensystems liegt, durch die Entrücktheit der Leber von Nerveneinflüssen überhaupt, verständlich erscheinen könnte, ist die Wirkungslosigkeit des Strychnins beachtenswert vom Standpunkt der Verwendung dieses Alkaloids bzw. des Extractum strychni als Stomachikum. Diese Wirkung wird nicht einem bisher unbekannten Stoffe, sondern dem Strychnin zugeschrieben. Eine solche, die Verdauung in irgend einer Weise fördernde Wirkung findet also jedenfalls nicht auf dem Wege einer Beeinflussung der Gallensekretion statt, und es nimmt nicht wunder, daß eine Substanz, von der vorzugsweise nervöse, und zwar zentrale, Wirkungen bekannt sind, auf die Leberzellen ohne Einfluß ist.

Die hemmende Wirkung von Chinin, Cocain und Morphin steht durchaus im Einklang mit dem, was von diesen Alkaloiden sonst bekannt ge-

[1]) *Head*, Die Sensibilitätsstörungen usw., Berlin 1898.

Tabelle VI.

Substanz	Dosis, Applikationsart, Zahl der Versuche	Wirkung auf Menge	Wirkung auf Konzentration
Radix Ononidis	0,2 g und 0,5 g Glucoside in 10 proz. Lsg. id (1 V)	keine	keine
„ Gentianae	0,2 g Glucoside in 10 proz. Lsg. id (1 V)	„	„
	0,4 g „ „ 10 „ „ id (1 V)	„	„
Cortex Condurango	0,2 g „ „ 10 „ „ id (1 V)	„	„
Herba Centaurii minoris	0,1 g und 0,2 g Glucoside in 10 proz. Lsg. id (3 V)	„	„
	0,2 g Glucoside in 10 proz. Lsg. id (1 V)	geringe Vermehrg.	geringe Vermehrg.

Tabelle VII.

Substanz	Dosis, Applikationsart, Zahl der Versuche	Wirkung auf Menge	Wirkung auf Konzentration
Morphinum hydrochloricum	0,025 g id (1 V)	Verminderung	Verminderung
Cocainum „	0,1 g in 2 proz. Lsg. id (1 V)	„	nicht untersucht
Chininum „	0,1 g „ 1 „ „ id (2 V)	„	Verminderung
	0,2 g „ 1 „ „ id (1 V)	„	„
Extractum Strychni	0,02 g iv (1 V)	keine	keine
	0,02 g id (1 V)	„	„

worden ist. Speziell die hemmende Wirkung des Chinins ist bereits von *Brugsch* und *Horsters* aus ihren Versuchen erschlossen worden. Vom Morphin ist bekannt, daß bei der chronischen Vergiftung die Sekretion der Verdauungsdrüsen, speziell die Magensaftsekretion und die des Pankreas, darniederliegen. Wie diese Versuche zeigen, ist an dieser allgemeinen Sekretionshemmung in hohem Grade auch die Leber beteiligt. Auch die akute Wirkung des Morphins bzw. Opiums auf den Darm findet zweifellos bereits unter Entwicklung einer weitgehenden Sekretionseinschränkung mutmaßlich aller Verdauungsdrüsen statt, welche ihrerseits erheblich an der stopfenden Endwirkung beteiligt ist. Beiläufig erwähnt dürfte auch sonst durch Morphin eine Sekretionseinschränkung hervorgerufen werden, auch bei Drüsen, welche, wie Mundspeichel- und Bronchialdrüsen, in erster Linie dem Nervensystem unterworfen sind. Die Wirkung auf die Gallensekretion deutet darauf hin, daß es sich um eine die Sekretions*zellen* selbst treffende Wirkung handelt, welche wohl in ähnlicher Weise zu deuten ist, wie die viel ausgeprägtere und länger dauernde Chininwirkung. Da bei Darreichung per os die Leber von allen Organen am intensivsten der Wirkung des Morphins unterworfen ist, dürfte die Leberwirkung bei dieser Darreichungsart stärker ausfallen als bei der gewöhnlich geübten subkutanen Applikation. Die Verwendung des Morphins im Gallensteinanfall geschieht zweifellos zur Kupierung der Schmerzen. Unter dem Eindruck der eben beschriebenen Morphinwirkung kann man an die *Möglichkeit* denken, daß auch eine andersartige Wirkung mitbeteiligt ist. Es ist zwar durchaus unbekannt, in welcher Weise eine Sekretionsänderung den Gallensteinanfall beeinflussen mag, es ist aber nicht ausgeschlossen, daß eine Minderung der Sekretion vielleicht von günstigem Einfluß begleitet sein kann.

Die hemmende Wirkung des intraduodenal gereichten Cocains ist gering, aber nicht zu übersehen. In Anbetracht dessen, daß die hervorstechendste Eigenschaft der Cocainwirkung, die lokal anästhetische, Folge einer alle Zellen treffenden Protoplasmawirkung ist, der bei längerer Dauer der Applikation besonders empfindliche Elemente (Cornealepithel) erliegen, wobei es selbst zu Nekrosen kommen kann, erscheint die beobachtete Sekretionshemmung vom Standpunkte einer allgemeinen Zellschädigung als vollkommen verständlich. Demnach wäre die Leberwirkung des Cocains in die gleiche Kategorie einzureihen wie die der Alkoholnarkotica und des Chinins.

Die allgemein bekannte Chininwirkung, der alles Lebende mit dem gleichen Endeffekt, wie er durch die Narkotica der Alkoholreihe herbeigeführt wird, verfällt, erstreckt sich, wie zu erwarten war, in ausgeprägter Weise auch auf die Lebersekretion, deren Herabsetzung wohl nicht anders gedeutet werden kann, als *Lähmung der Sekretionszellen*. Diese äußert sich, wie beim Amylalkohol, nicht nur in einer Volumen- und Konzentrationsabnahme, sondern besonders auffällig in einer Änderung der Gallenfarbstoffproduktion. Wie beim Amylalkohol, wird auch nach Chiningaben die verminderte und verdünnte Kaninchengalle gelb, was ich immer bei einer tiefgehenden Beschädigung der Leber beobachtet habe. Die Wirkung ist langdauernd, wie bei den Alkoholnarkoticis, insbesondere beim Chloroform, und gibt sich auch darin kund, daß sonst prompt und mächtig wirkende Cholagoga nur von geringer Wirksamkeit sind. Bei der stark ausgeprägten Chininwirkung wird man dieses Alkaloid wohl nicht mehr als ein so harmloses Mittel ansehen dürfen

wie bisher. Namentlich die chronische Darreichung erscheint unter dem Eindruck der Versuchsergebnisse nicht unbedenklich. Ja, man wird daran denken müssen, ob die bekannten, sonst der Malaria zugeschriebenen Leberschädigungen nicht etwa durch die jahrelange Chininmedikation mitverschuldet werden. Auch hier kann wieder die Analogie mit dem Alkohol bzw. Fuselöl herangezogen werden, denn sowohl der chronische Alkoholismus, als auch die chronische Malaria führen häufig zu cirrhotischen Leberveränderungen. Es ist durchaus nicht ausgeschlossen, daß solche auf der Basis einer primären Schädigung der Leberzellen entstehen, welche sich zuerst in einer Minderung der Sekretion äußert.

8. Sonstige chemische Präparate. (Tabelle VIII.)

Vielleicht bei keinem anderen Stoffe findet sich die eingangs erwähnte Unstimmigkeit der Literaturangaben über die pharmakologische Beeinflussung der Gallensekretion so ausgeprägt, wie bei der *Salicylsäure*, deren Wirkung auf die Gallensekretion in überaus zahlreichen Mitteilungen besprochen wird. Als deren Zusammenfassung mag der Satz des *Meyer-Gottlieb*schen Lehrbuches gelten, daß benzoesaures und salicylsaures Natrium in geringem Grade fördernd auf die Gallensekretion wirken. *In meinen Versuchen blieb jede Wirkung, unabhängig von der Applikationsart, aus.* Da, wie schon erwähnt, meine Versuchsanordnung auch negative Ergebnisse voll zu werten gestattet, muß ich der Salicylsäure jede Wirkung auf die Gallenproduktion absprechen. Zu dem gleichen Ergebnis kamen in letzter Zeit *Pohl* und *Brugsch* und *Horsters*. Von Wichtigkeit ist es, daß die Salicylsäure in der Galle nur nach intravenöser Zufuhr und auch da nur in Spuren nachweisbar ist. Man wird daher auch von einer desinfizierenden Wirkung der Salicylsäure bei infektiös-entzündlichen Prozessen der Gallenwege kaum etwas erwarten dürfen.

Anders liegen vielleicht die Verhältnisse beim *Urotropin*, welches zwar auch keinerlei Wirkung auf die Gallensekretion auszuüben vermag. Ich konnte in einem ad hoc angestellten Versuch nach intravenöser Injektion von 2 g Urotropin *Schering* mittels der Sublimatfällung unzersetztes Hexamethylentetramin leicht nachweisen. Die normale Kaninchengalle gibt beim Versetzen mit gesättigter wässeriger Sublimatlösung eine geringe hauchartige Trübung, während nach Urotropininjektion eine deutliche körnige, weiße Fällung erhalten wird. Dagegen ist es fraglich, ob in der Galle nach Urotropininjektion freier Formaldehyd auftritt. Nach Entfernung des Schleimes durch Essigsäurefällung erhielt ich in der Urotropingalle mit dem Reagens von *Jorissen-Trendelenburg*[1]) (1 Proz. Phloroglucin in 33proz. Lauge) eine nur unsichere Rosafärbung, während normale Galle eine reine Gelbfärbung gab.

Das *Atophan* ist in letzter Zeit Gegenstand ausgedehnter Untersuchungen von *Brugsch* und *Horsters* (l. c.) gewesen, welche ihm eine exquisit galletreibende („choleretische") Wirkung zuschreiben, es als Cholagogum unter besonderen Namen (Ikterosan und Atophanyl) in die Therapie eingeführt haben. Die hierauf von ihnen und *Grunenberg* und *Ullmann*[2]) beim Menschen, namentlich beim katarrhalischen Ikterus gemachten Erfahrungen lauten sehr günstig im Sinne eines therapeutischen Effekts. Beim Menschen erschlossen dieselben Autoren aus Untersuchungen mittels der *Einhorn*schen

[1]) *Trendelenburg*, diese Zeitschr. **95**, 146, 1919.
[2]) Med. Klinik **20**, 663, 1924.

Duodenalsondierung und bei einem Fistelfalle ebenfalls eine choleretische Wirkung. Inwiefern eine solche die Ursache für den therapeutischen Erfolg beim katarrhalischen Ikterus sein mag, wird nicht näher diskutiert und erscheint auch nicht ohne weiteres verständlich. Ich habe das Atophan, und zwar sein lösliches Natriumsalz, das Atophannatrium, schon vor den Veröffentlichungen *Brugschs* mit vollkommen negativem Erfolge untersucht. Ich vermutete unter Berücksichtigung des Umstandes, daß die bei uns[1]) aufgefundene und vielfach studierte antiphlogistische Wirkung des Atophans der des Chinins dem Wesen nach wahrscheinlich nahe verwandt ist, eine chininartige Hemmung der Gallensekretion durch Atophan. Eine solche zeigte sich denn auch in einem meiner Versuche, allerdings in geringem Maße und vorübergehend, während in den anderen Versuchen die intraduodenale Darreichung des Atophannatriums vollkommen wirkungslos gewesen ist. Dieses Ergebnis spricht zweifellos *gegen* eine dem Chinin gleiche Elementarwirkung des Atophans. Damit wird die antiphlogistische Wirkung des Atophans, die vielleicht mehr als man bisher meint bei seiner vielfachen therapeutischen Anwendung in Betracht kommt, um so interessanter, und man wird, um ihr Wesen aufzuklären, auf indirekten Wegen zum Ziele zu kommen suchen müssen. Nach den Veröffentlichungen von *Brugsch* und *Horsters* habe ich die Untersuchung des Atophans wieder aufgenommen. Ich erwähnte bereits, daß die von mir geübte Methode der Urethannarkose laut zahlreichen und immer wieder gleichmäßig verlaufenden Kontrollversuchen nicht etwa mit dem Fehler arbeitet, daß durch das Urethan die Lebertätigkeit gehemmt und damit eine eventuell cholagoge Wirkung von Substanzen verhindert wird. Denn das Urethan ist im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Alkoholnarkoticis ohne die geringste Hemmungswirkung auf die Lebersekretion, weder bei intraduodenaler, noch bei intravenöser Darreichung. Es konnte also die

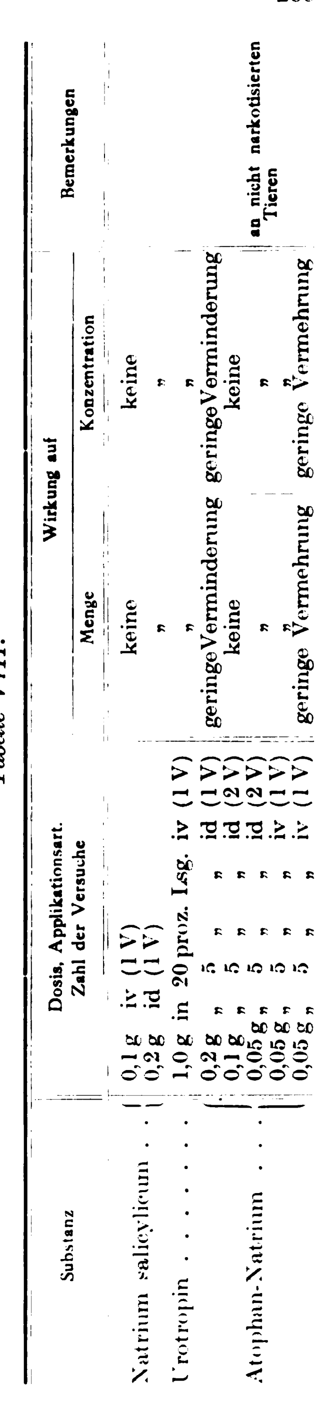


Tabelle VIII.

Substanz	Dosis, Applikationsart. Zahl der Versuche	Wirkung auf: Menge	Wirkung auf: Konzentration	Bemerkungen
Natrium salicylicum . . .	0,1 g iv (1 V)	keine	keine	
	0,2 g id (1 V)	"	"	
Urotropin	1,0 g in 20 proz. Lsg. iv (1 V)	"	"	
Atophan-Natrium . . .	0,2 g " 5 " " id (1 V)	geringe Verminderung	geringe Verminderung	
	0,1 g " 5 " " id (2 V)	keine	keine	
	0,05 g " 5 " " id (2 V)	"	"	an nicht narkotisierten Tieren
	0,05 g " 5 " " iv (1 V)	"	"	
	0,05 g " 5 " " iv (1 V)	geringe Vermehrung	geringe Vermehrung	

[1]) *Wiechowski* und *Starkenstein*, Münch. med. Wochenschr. 1913, S. 107; *Starkenstein*, diese Zeitschr. **106**, 172. 1920.

Verwendung des Urethans nicht die Ursache für die andersartige Wirkung des Atophans in meinen Versuchen gegenüber jenen von *Brugsch* und *Horsters* sein. Nichtsdestoweniger habe ich in zwei neuerlichen Versuchen an Tieren gearbeitet, die nur während der kurze Zeit dauernden Bauchoperation mit Äther leicht narkotisiert wurden und nachher kein Narkoticum erhalten hatten. Um den Einfluß auch dieser kurzen Äthernarkose (s. oben) völlig auszuschalten, habe ich erst 1 Stunde nach Beendigung der Operation (bzw. Narkose) mit der Messung der Sekretionsgeschwindigkeit begonnen und das Atophan erst nach vier Normalperioden, à 15 Minuten, also noch eine weitere Stunde später gereicht. Auch in diesen Versuchen habe ich jede Andeutung einer „choleretischen" Wirkung des Atophans vermißt. In einer dritten Versuchsreihe habe ich das Atophannatrium intravenös gereicht. In einem Versuch wurde zwar eine geringe und rasch vorübergehende (auf zwei Perioden von 15 Minuten beschränkte) Sekretionssteigerung beobachtet, aber in einem zweiten Versuch blieb dagegen jegliche Wirkung auch bei intravenöser Darreichung aus. Selbstverständlich unterblieb in keinem der angestellten Atophanversuche die von mir bei negativen Versuchen stets vorgenommene Kontrollinjektion von Galle bzw. Cholaten. Während das Atophan wirkungslos war, hat die nachfolgende Injektion von Galle immer eine beträchtliche Sekretionssteigerung bewirkt. Ich kann daher die experimentellen Ergebnisse von *Brugsch* und *Horsters* nicht bestätigen und *muß dem Atophan eine steigernde Wirkung auf die Gallensekretion absprechen.* Allerdings lassen sich meine Versuche mit denen von *Brugsch* und *Horsters* an Fistelhunden nicht direkt vergleichen. Trotzdem kann ich es mir durchaus nicht erklären, daß bei meiner Versuchsanordnung eine fördernde Wirkung nicht hätte hervortreten sollen, wenn sie dem Atophan in der Tat auf die normale Lebersekretion zukommt. Ich glaube im Gegenteil, daß, falls eine solche sich aus den Versuchsergebnissen von *Brugsch* und *Horsters* zwingend ergibt, sie bedingt ist durch die Besonderheit der von diesen Autoren angewandten Versuchsmethodik. Ja, meine Erfahrungen am Kaninchen führen mich eher zu der Auffassung, daß größere Dosen von Atophan die Lebersekretion herabzusetzen imstande sind, was besonders bei chronischer Darreichung möglich wäre. Damit soll aber durchaus nicht der therapeutische Effekt des Atophans beim katarrhalischen Ikterus und bei ähnlichen Lebererkrankungen irgendwie in Frage gestellt werden. Ein solcher erscheint mir auf der Basis der antiphlogistischen Wirkungsweise des Atophans durchaus möglich und aus dieser heraus verständlicher erklärbar als durch eine durchaus unsichere Sekretionssteigerung der Leber. Das Atophan erschien in meinen Versuchen auch nicht in der Galle: Ihr saurer Ätherextrakt, welcher es hätte enthalten müssen (künstlich zugesetztes Atophan ist in ihm gefunden worden), blieb, in angesäuertem Wasser aufgenommen, mit Phosphorwolframsäure klar, welche das Atophan bei mineralsaurer Reaktion noch in großer Verdünnung flockig fällt.

III.

Zusammenfassung.

1. Die Unzulänglichkeit der bisherigen Forschungsergebnisse über die Physiologie und Pharmakologie der Lebersekretion ist durch die bisher fast allgemein angewandte Methodik (Hunde mit chronischer Gallenfistel) bedingt. Die Ausarbeitung einer brauchbaren Methodik

hat es ermöglicht, nicht nur die bisher strittigen Fragen hinsichtlich der Sekretionswirkung einzelner Substanzen aufzuklären, sondern auch eine Reihe von physiologisch wichtigen Tatsachen in diesem Teile der Verdauung zu ermitteln. Das Wesentliche dieser Methodik besteht darin, daß die physiologische Bedeutung des Kreislaufs der Galle erkannt und für die Methodik ausgenutzt wurde unter Verwendung einer Narkoseart, welche die Lebertätigkeit in keiner Weise beeinflußt. Alle Versuche wurden an Kaninchen ausgeführt, welche sich deshalb besonders eignen, weil sie eine kontinuierliche und nicht eine intermittierende Darmverdauung wie die Fleischfresser haben[1]). Doch läßt sich diese Methode auch an Hunden (weniger gut an Katzen) gebrauchen, denn auch bei diesen Tieren besteht, unabhängig von der durch die Darmverdauung hervorgerufenen Steigerung der Lebersekretion, eine, wenn auch geringe, so doch meßbare und regelmäßige Absonderung von Galle im nüchternen Zustande. Das Abgehen späterer Untersucher von der *Rutherford*schen Methode der *akuten* Fistel ist die alleinige Ursache dafür, daß es auf diesem Gebiete so wenige experimentell gesicherte Kenntnisse gibt. Aber auch die Methode von *Rutherford* war mit dem prinzipiellen Fehler behaftet, daß wegen der dauernden Gallenverluste im Verlauf des Experimentes das Verhalten der Leber immer unphysiologischer wurde. Die Leber braucht zu ihrer normalen Tätigkeit, die, wie gesagt, auch beim Fleischfresser kontinuierlich ist, die aus dem Darmkanal rückresorbierte Galle, welche geradezu als das physiologische Reizmittel für ihre Tätigkeit angesehen werden muß.

Durch die Einführung der regelmäßigen Reinjektion der in kurzen Zeiträumen sezernierten Galle in das Duodenum wurde eine derart regelmäßige Sekretionsgeschwindigkeit erzielt, daß selbst kleine Schwankungen als gesicherte Wirkungen eines Eingriffs erkannt werden können. Durch eine am Schlusse des Experiments vorgenommene Kontrollinjektion von Galle oder Cholaten konnten die erhaltenen Versuchsresultate außerdem in dem Sinne gesichert werden, daß das betreffende Versuchstier als für Lebersekretionsversuche brauchbar erkannt wurde und die allerdings sehr seltenen, gegen Galleninjektion refraktären Tiere ausgeschaltet werden konnten.

2. Die normale Lebersekretion von Kaninchen ist weitgehend unabhängig von Geschlecht, Alter und Gewicht der Tiere. Sie beträgt durchschnittlich 8,9 ± 0,67 g Galle pro Stunde, die meisten Tiere haben eine Stundengeschwindigkeit von 8 bis 10 g Galle. Während die Sekretionsgeschwindigkeit der Spezies Kaninchen nur auf 34 Proz. genau definiert ist, hat das einzelne Tier eine weitaus genauer definierte

[1]) Über die Eignung der Meerschweinchen s. *Stransky* l. c.

Sekretionsgröße. Sie ist schon auf 2,4 Proz. genau. Denn die Geschwindigkeit in einem wahllos herausgegriffenen Versuch betrug pro Viertelstunde 2,46 ± 0,006 g im Durchschnitt. Theoretisch können daher bereits Ausschläge, welche pro Viertelstunde über 0,05 g liegen, verwertet werden. Tatsächlich wurden aber die größten beobachteten Normalschwankungen, nämlich 0,1 bis 0,2 g als Grenze angesehen und nur darüber hinausgehende Ausschläge zur Verwertung herangezogen. So war es möglich, auch nur schwach cholagog wirkende Substanzen als solche zu erkennen, wie z. B. kleine Dosen von ätherischen Ölen, deren Wirkung sich in Ausschlägen von 0,3 bis 0,5 g pro Viertelstunde geäußert hat. Aus diesem Beispiel geht die Eignung der angewandten Methode hervor. Bei Einhaltung längerer Messungsperioden müssten derartige Schwankungen dem Beobachter entgehen.

Puerperale, säugende Tiere weisen zumeist eine abnorm große und unregelmäßige Lebersekretion auf.

Es scheint ein allgemeines Gesetz für die Lebersekretion, vielleicht für alle echten Sekretionen zu sein, daß mit einer Steigerung des Volumens gleichzeitig eine solche der Konzentration verbunden ist, und umgekehrt bei einer Volumenabnahme gleichzeitig auch eine Verminderung der Konzentration eintritt. Weit mehr also als im Gesamtgewicht der Galle äußern sich die Schwankungen bzw. Wirkungen leberaktiver Substanzen im Gewicht der Trockensubstanz. Es ist sicher bemerkenswert, daß unter den zahlreichen untersuchten Stoffen nicht eine einzige gefunden wurde, welche bei erhaltenem Volumen eine Verdünnung der Galle hervorgerufen hätte, sondern eine solche ist immer nur Begleiterscheinung einer toxischen Hemmung der Lebertätigkeit.

Auch in meinen Versuchen ergab sich kein Anhaltspunkt dafür, daß die Lebertätigkeit durch nervöse Mechanismen beeinflußt werden kann. Die das vegetative Nervensystem angreifenden Stoffe erwiesen sich alle eigentlich als wirkungslos. Die Gallenbereitung wird also im wesentlichen auf chemischem Wege durch die Blutzusammensetzung reguliert. Bemerkenswerterweise ist jedoch eine weitgehende Blutverdünnung durch Infusion physiologischer Salzlösung ohne Einfluß, speziell ohne fördernden auf die Gallensekretion.

Wahrscheinlich ist es nicht gleichgültig, auf welchem der beiden Zirkulationssysteme die Substanzen die Leber erreichen. Die intraduodenale (stomachale) Applikation sollte die wirksamere sein als die parenterale, bei welcher die Substanzen gleichmäßig über den ganzen Organismus verteilt werden, während sie bei der ersteren in ihrer Gesamtheit die Leber passieren müssen. Bemerkenswerterweise ist aber die Wirkung der Galle und der Cholate nicht nur rascher, sondern auch ausgiebiger bei intravenöser Zufuhr als bei intraduodenaler.

soweit man die Sekretionswirkung bei verschiedenen Tieren überhaupt vergleichen kann. Auch vom Karlsbader Mineralwasser muß gesagt werden, daß die intravenöse Applikation die sicherer wirksame ist, wenn aber die Wirkung nach intraduodenaler Applikation deutlich in Erscheinung tritt, ist sie ausgiebiger als die intravenöse. Zweifellos kommt es da auf das Schicksal bzw. die Organotropie der betreffenden Substanzen und andererseits auf die wohl nicht allgemein gleichen Resorptionsgeschwindigkeiten vom Dünndarm aus an, deren anzunehmende Schwankungen und Beeinflußbarkeiten im Experiment nicht beherrscht werden können. Sollte sich in der Tat in dieser Beziehung eine Ausnahmestellung der Gallensäuren ergeben, so wäre sie durch ihre absolute Hepatotropie bzw. Cholotropie leicht erklärlich, welche bei jeglicher Applikationsart mit großer Geschwindigkeit und am schnellsten bei intravenöser Injektion das gesamte Material in der Leber sich anreichern läßt.

3. Wie die Lebersekretion bei der *Verdauung* abläuft, ist zwar im wesentlichen bekannt gewesen. Die vorstehenden Versuche haben es aber wahrscheinlich gemacht, daß nicht die *Nahrungsstoffe* als solche, wie es die *Pawlow*sche Schule gelehrt hat, einen spezifischen Einfluß ausüben. Reine Eiweißkörper und deren Produkte der tryptischen und peptischen Verdauung, Kohlehydrate und wahrscheinlich auch Fette sind als solche wirkungslos. Die immer wieder beobachtete Sekretionssteigerung durch Albumosen rührt höchstwahrscheinlich von beigemengten Stoffen vom Charakter der Sekretine her. Diese spielen bei der natürlichen Sekretion der Verdauungsdrüsen eine größere Rolle, als man bisher meinte, da sie nicht nur von der Blutbahn aus, sondern auch bei direkter Berührung mit der Magenschleimhaut wirksam sind. Diesen in den *Nahrungsmitteln* vorgebildeten, bei Bereitung der Speisen wahrscheinlich in größerer Menge entstehenden Stoffen, sowie den aus der Dünndarmschleimhaut durch die Magensalzsäure extrahierten körpereigenen *Sekretinen* ist die nach jeder Nahrungsaufnahme einsetzende Steigerung der Gallensekretion zuzuschreiben. Es ist wahrscheinlich, daß diese Stoffe in irgend einer Beziehung zum Histamin stehen und dieses selbst, welches, per os aufgenommen, bekanntlich hämodynamisch und auf die glatte Muskulatur wirkungslos ist, wirkt bei der Resorption vom Dünndarm aus auch sekretionssteigernd. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß das Histamin schon normalerweise eine gewisse Rolle spielt, zumal aus *Abels* Untersuchungen bekannt ist, daß bei jeder Art von Eiweißhydrolyse Stoffe entstehen, die sich chemisch und physiologisch wie Histamin verhalten. Olivenöl hatte zwar eine geringe hemmende Wirkung, doch muß es weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, zu entscheiden, ob diese Wirkung den chemisch reinen Fetten (Triglyceriden der Fettsäuren) zukommt oder etwa irgend einem Begleitstoff.

Die bei der Bereitung der Speisen (Bromatik) verwendeten *Gewürze*, einerseits vom Charakter der Wärmenerven erregenden (Paprika, Pfeffer), andererseits vom Charakter der außerdem hyperämisierenden und schließlich Entzündung erregenden (Senföl, Zwiebel, Rettich) sind ohne direkten Einfluß auf die Lebersekretion. Ihre Bedeutung als zweckmäßige Zusätze zu Speisen muß auf anderen Gebieten liegen. Dagegen erwiesen sich jene ätherischen Öle, welche als Wirkstoffe in einigen Gewürzen (Fenchel, Anis, Kümmel usw.) enthalten sind, als schwache Förderer in jenen Konzentrationen wenigstens, in welchen sie normalerweise mutmaßlich verwendet werden.

Nicotin und Coffein als wirksame Bestandteile der als *Genußmittel* allgemein gebrauchten Kaffee, Tee, Tabak sind als wirkungslos befunden worden.

4. Die Beeinflussung der Darmmotilität sowie der Darmschleimhaut ist ohne Einfluß auf die Sekretionsgeschwindigkeit der Leber. Weder eine *entzündliche Reizung* der *Darmschleimhaut* (Senföl, Zwiebel, Crotonöl), noch eine Steigerung der *Dünndarmmotilität* (Kalomel, Ricinusöl, Crotonöl, Jalapa, Gutti, Koloquinten), noch eine Beeinflussung der *Dickdarmmotilität* durch Anthrachinonglucoside (Rheum, Frangula, Aloe) vermag einen Einfluß auf die Lebersekretion auszuüben, wiewohl die letztgenannten Stoffe entgegen der geltenden Anschauung bereits im Dünndarm resorbiert werden, in der Galle erscheinen und deren Kreislauf mitmachen. Dagegen ist eine starke „Vermehrung des Succus entericus“ als solche, wie schon *Rutherford* beobachtet hat, einerlei wie sie zustande kommt, von einer Minderung der Gallensekretion begleitet.

5. Die *Narkotica* der *Alkoholreihe* setzen prinzipiell alle die Sekretionsgeschwindigkeit der Galle herab, sind zum Teil geradezu von ausgesprochener Giftigkeit für die Leber, die sich in exzessiven Fällen in einer Verfärbung der verminderten und verdünnten Galle äußert. Besonders das Chloroform scheint für die Leber ein größeres Gift als für das Zentralnervensystem zu sein. Es bestehen hinsichtlich der Stärke dieser Leberwirkung erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Alkoholnarkoticis. Das *Urethan* ist ganz ohne Einfluß auf die Lebersekretion, und zweifellos werden sich bei einer systematischen Untersuchung, die zu einer Gruppierung der gebräuchlichen Schlafmittel führen soll, noch andere auf die Lebersekretion unwirksame auffinden lassen.

6. Ähnlich wie die Alkoholnarkotica wirkt das *Chinin*, dessen Protoplasmawirkung in mancher Beziehung der des Alkohols und seiner pharmakologischen Homologen nahesteht. Die Empfindlichkeitsunterschiede der einzelnen Zellen müssen aber gegenüber der Chininwirkung andere sein als gegenüber der Wirkung der Alkoholnarkotica.

So ist besonders die Nervenzelle nicht die gegen Chinin am empfindlichsten reagierende, ja ihre Endigungen scheinen, umgekehrt wie beim Alkohol, stärker empfänglich zu sein. (Lokalanästhetische Wirkung des Chinins, die sich sogar nach der Resorption bis zu einem gewissen Grade äußern kann.) Die Leber scheint aber gegen beide Gruppen die gleiche Empfindlichkeit aufzuweisen. Neben dem Chloroform und Amylalkohol ist das Chinin unter allen untersuchten Substanzen diejenige, welche die Lebersekretion in ausgesprochenster Weise unter Auftreten der mehrfach erwähnten Verfärbung der Galle herabsetzt. Es kann wohl angenommen werden, daß die von *Morgenroth* dargestellten und studierten Hydrocupreinderivate ebenso, vielleicht noch stärker leberschädigend wirken werden. Von Interesse wird es auch sein, die Wirkung des Chinidins mit der des Chinins auf die Leber zu vergleichen, dessen erheblich stärkere Wirkung auf die Refraktärphase des Herzens darauf hindeuten kann, daß ihm möglicherweise auch andere Chininwirkungen in verstärktem Maße zukommen werden. Von den sonstigen untersuchten *Alkaloiden* ist nur das Morphin von einer nennenswerten hemmenden Wirkung befunden worden. Schwächer ist die durch Cocain bedingte Hemmung. Diese Tatsache ist von allgemein pharmakologischem Interesse, da die sowohl dem Chinin als auch dem Cocain zukommende lähmende Wirkung auf die sensiblen Nervenendigungen beim Cocain viel ausgesprochener ist. Die Leberwirkung des Morphins und des Chinins ist vielleicht nicht ohne Einfluß auf Teilsymptome einerseits des chronischen Morphinismus, andererseits auf die bei der chronischen Malaria geübte Chininmedikation bzw. bei ihr auftretende Leberschädigungen.

7. Den *ätherischen Ölen* müssen wir auf Grund mehrfacher im hiesigen Institut ausgeführter Untersuchungen eine Elementarwirkung zuschreiben, welche der der Alkoholnarkotica zumindest ähnlich ist: in größeren Dosen kommt ihnen eine auf Grund ihrer physikalischen Eigenschaften (Lipoidlöslichkeit, Teilungskoeffizient) zu erwartende, zentral narkotische Wirkung zu. Interessant ist es nun, daß sie in *kleinen* Gaben, soweit sie von mir untersucht worden sind, eine fördernde Wirkung auf die Gallensekretion haben, von der bei den Alkoholnarkoticis auch keine Andeutung zu sehen war. Das Menthol wirkte am intensivsten galletreibend. Soweit sie als Gewürzstoffe Anwendung finden, kann man ihnen daher eine fördernde Wirkung zuschreiben, welche in ihrem Ausmaß der der Sekretine ähnlich sein dürfte. Sie scheinen auch andere Sekretionen fördernd beeinflussen zu können. Auch hier dürfte wieder das Maßgebende eine verschieden abgestufte Empfindlichkeit der einzelnen Zellen und Organe sein: der lähmenden Wirkung der ätherischen Öle ist insbesondere die glatte Muskulatur unterworfen. Versuche mit großen Dosen intraduodenal

gegebenen Camphers zeigten, daß die alkoholartige hemmende Grundwirkung der ätherischen Öle auch an den Sekretionszellen, wenigstens an der Leber, nachgewiesen werden kann. Für die Wirkung der ätherischen Öle bzw. ihrer Stammdrogen auf die Lebertätigkeit in toto kommt aber in erster Linie und mehr als die Sekretionswirkung die spasmolytische Wirkung in Betracht, welche sie auf die Gallenwege ausüben.

8. Weitaus stärker fördernd als die ätherischen Öle erwiesen sich außer den Gallensäuren und ihren Derivaten, über deren Einfluß auf die Gallensekretion keine Meinungsverschiedenheit herrscht, unter allen untersuchten Substanzen das *Podophyllin* und das *Karlsbader Mineralwasser*. Hinsichtlich der Intensität ihrer sekretionsfördernden Wirkung stehen diese beiden den Cholaten kaum nach; ihre Wirkung verläuft aber anders. Galle und Cholate wirken, besonders bei intravenöser Zufuhr, plötzlich, stoßartig, die Geschwindigkeit steigt rasch und hoch an, verharrt aber nur kurze Zeit auf dem erreichten Niveau, um bald auf die Norm abzusinken. Die Wirkung der beiden anderen Stoffe, einander ähnlich, ist hingegen protrahierter, einer flachen Welle ähnlich: der Höhepunkt der Wirkung wird später erreicht, aber das erreichte Niveau längere Zeit eingehalten und der Abfall erfolgt wesentlich langsamer als der Anstieg. Die Wirkung des Karlsbader Mineralwassers ist höchstwahrscheinlich zwar grundsätzlich dem in ihm enthaltenen Sulfation zuzuschreiben, aber durch Sulfate allein kann eine nennenswerte cholagoge Wirkung erst in so beträchtlicher Konzentration erzielt werden, daß ihre praktische Verwertbarkeit zu diesem Zwecke fraglich ist. Offenbar sind die anderen Bestandteile des Mineralwassers dafür verantwortlich zu machen, daß die Leberzellen eine erhöhte Empfindlichkeit für das Sulfation erlangen, wiewohl sie, soweit bekannt, an sich keinen Einfluß auf die Gallensekretion haben. Wie das Sulfation unter den anorganischen Ionen, steht auch das Podophyllin seinerseits ebenso isoliert da. Denn die grob chemisch ganz ähnlichen Substanzen, (Harze, Harzsäuren), wie die oben erwähnten Gutti und Jalapa, ließen eine derartige Wirkung völlig vermissen.

9. Diesen wenigen cholagogen Stoffen, zu denen neben Galle und Cholaten, dem Karlsbader Mineralwasser und dem Podophyllin nur noch die Sekretine und die ihnen bis zu einem gewissen Grade ähnlich wirkenden ätherischen Öle gezählt werden können, steht eine weitaus größere Anzahl als unwirksam befundener Substanzen gegenüber: die organischen Abführmittel, die scharfen Gewürze, die reinen Nährstoffe, Wasser und Salze, Coffein, Nicotin, Strychnin und andere Alkaloide sind bereits genannt. Erwähnenswert ist aber auch die Unwirksamkeit einer Reihe von Bitterstoffglucosiden (Ononis, Gentiana,

Condurango, Centaurium), die als Digestionsmittel vielfach in Gebrauch sind. Auch eine Reihe von synthetischen Präparaten, die mit der Gallensekretion in Zusammenhang gebracht worden sind, haben sich als unwirksam erwiesen: die Salicylsäure, Urotropin, Atophan.

10. Bemerkenswert sind die Beziehungen zwischen Ausscheidung von Substanzen in der Galle und Sekretionswirkung. Die diesbezüglichen Befunde weisen mit aller Sicherheit darauf hin, daß beide vollständig unabhängig voneinander sind. Während die Anthrachinonglucoside und Urotropin ausgeschieden werden, ohne eine Sekretionswirkung zu haben, während die schwach wirksamen ätherischen Öle zum Teil in der Galle ausgeschieden werden, führt das stark cholagoge Karlsbader Wasser zu keiner merkbaren Vermehrung der normalen (geringen) Sulfatausscheidung in der Galle. Und schließlich werden die stark wirksamen Gallensäuren wohl quantitativ in der Galle zur Ausscheidung gebracht. So wenig also die „cholotrope“ Eigenschaft einer Substanz etwas für die Sekretionsbeeinflussung aussagt, so kann sie doch von therapeutischer Bedeutung sein, wenn diesen Substanzen *lokale* Wirkungen zukommen, die sich an den Gallenwegen äußern können (Anthrachinonglucoside, Urotropin, ätherische Öle). Hinsichtlich der Ausscheidung von Substanzen in die Galle sind nur gelegentliche Beobachtungen gemacht worden, die zum Teil mit den Literaturangaben nicht übereinstimmen. Zweifellos wird auch dieser Teil der Leberpharmakologie einer neuerlichen, speziellen Bearbeitung unterzogen werden müssen, denn die Bedenken, die die bisher fast allgemein verwandte Methode der chronischen Fistel hinsichtlich der Erkennung einer Sekretionsbeeinflussung erwecken, gelten wohl auch für die Sicherheit der Resultate von Ausscheidungsversuchen. Jedenfalls ist die Ausscheidungsfähigkeit von Substanzen in die Galle für deren therapeutische Beurteilung von nicht zu unterschätzender Bedeutung.

11. Hinsichtlich der therapeutischen Schlüsse, welche aus den vorgelegten Ergebnissen zu ziehen sind, sei betont, daß über die therapeutische Bedeutung einer Steigerung oder Minderung der Gallensekretion gegenwärtig nichts ausgesagt werden kann. Es ist Sache der Klinik, festzustellen, inwieweit solche Änderungen der Sekretionsgeschwindigkeit pathologisch bedeutungsvoll und gegebenenfalls therapeutisch wünschenswert sind. Das pharmakologische Experiment kann nur aufzeigen, welche Substanzen fördern und welche hemmen, aber niemals über die therapeutische Bedeutung der Förderung oder Hemmung als solcher etwas aussagen.

Ganz allgemein wird man aber schließen können, daß die sekretionsfördernden Substanzen an sich wohl auch einen fördernden Einfluß auf das Gesamtorgan, die Leber, und umgekehrt die hemmenden

einen schädigenden Einfluß auf die Leberzellen haben werden. Das letztere geht jedenfalls zur Evidenz aus dem sonstigen pharmakologischen Charakter jener Substanzen hervor, die auf die Gallensekretion in erheblicherem Ausmaß hemmend wirken (Chloroform, Chinin!). Die therapeutischen Erfolge, die die Klinik in letzter Zeit bei der Anwendung verschiedener cholagoger Stoffe zu verzeichnen hat, können auch in dem Sinne gedeutet werden, daß die cholagoge Wirkung nur ein Zeichen für die Förderung anderer, weitaus wichtigerer Funktionen der Leber ist.

Die Tätigkeit der für die spezielle Pathologie und Therapie der Lebererkrankungen so ungemein wichtigen, mit glatter Muskulatur ausgestatteten ableitenden Gallenwege einschließlich des Sperrapparates zum Darmkanal (*Oddi*) ist längst als vom vegetativen Nervensystem abhängig erkannt worden. Dieser Teil der Leberpharmakologie bildet kaum etwas wesentlich Besonderes und ist in seinen Grundzügen wohl erledigt. Viel sicherer sind also therapeutische Schlüsse zu ziehen aus den hier nicht behandelten Wirkungen von Substanzen auf die glatte Muskulatur, unabhängig davon, daß manche von ihnen (Campher, Menthol) gleichzeitig eine schwache cholagoge Wirkung zeigen.

Schließlich kann man aus lokalen Wirkungen von Stoffen, die in die Galle ausgeschieden werden, therapeutische Effekte bei Erkrankungen der Gallenwege erwarten, wenn ihnen lokale Wirkungen im Sinne einer Antiphlogose (Anthrachinonderivate) oder einer Desinfektion (Urotropin) auf die Schleimhaut oder einer Spasmolyse (ätherische Öle) auf die glatte Muskulatur zukommen.

Über den Einfluß der Ionenmischung des Milieus auf die Tonuseinstellung der Darmmuskulatur durch Acetylcholin, Pilocarpin und Adrenalin.

Von

Jaume Pi-Suner Bayo (Barcelona).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 30. Dezember 1924.)

Die Tonusregulierung der glatten Muskulatur erfolgt durch das vegetative Nervensystem im Verein mit den Wirkungen des Milieus auf dieses, auf die in trophischer Abhängigkeit von der Muskelzelle stehenden hypothetischen Zwischensubstanzen und auf die Muskelzelle selbst. Das Milieu wirkt vorzüglich durch den Gehalt der Gewebsflüssigkeit an Hormonen und Ionen. Bei der Hormon- und Ionenmischung kommt es nicht nur auf den Gehalt der Flüssigkeit an einzelnen Hormonen und Ionen, sondern ganz besonders auch auf die relativen Hormon- und Ionenmengen an, d. h. auf das Verhältnis der einzelnen Hormone und Ionen in der Lösung zueinander.

Danach können Tonusstörungen entstehen bei der Lähmung oder Reizung einzelner Komponenten des vegetativen Nervensystems oder bei Störungen in der hormonalen Zusammensetzung oder der Ionenmischung der Körperflüssigkeit.

In seiner zusammenfassenden Darstellung über die nervöse Tonusregulation der Magen-Darmmuskulatur kommt *Bickel* (1) auf Grund des in der Literatur vorliegenden Beobachtungsmaterials, wie auf Grund von Arbeiten, die im Verlauf der letzten Jahre in dem hiesigen Laboratorium ausgeführt wurden, zu dem Schlusse, daß die glatte Muskelzelle zum Zwecke der Tonusregulierung vom Parasympathicus tonussteigernd wirkende (tonuspositive) Erregungen empfängt, vom Sympathicus aber, und zwar wahrscheinlich auf zwei Bahnen, sowohl tonusfördernde, wie den Tonus dämpfende (tonusnegative) Erregungen bekommt. Bei der Annahme dieser für die Tonusregulierung vorhandenen dreifachen Innervation der Muskelzelle müßten an ihr auch drei Zwischensubstanzen, eine parasympathische und zwei sympathische

gefordert werden. Diese Anschauung geht mit denjenigen von *Pal* (2), wie auch in gewissem Sinne mit der von *Contarde* und *Guyon* (3) konform.

Wenn man nun unter Ausschaltung der zentralen Erregungen am ausgeschnittenen und in Ringerlösung suspendierten Magen oder an Darmstücken arbeitet, dann muß der Tonus der Muskulatur dieses Teiles des Verdauungsrohres unter der Voraussetzung der Konstanz der Milieubeschaffenheit und der Erregbarkeit der Muskelzelle selbst, von dem Erregungszustand der Zwischensubstanz abhängen. Der jeweilige Tonus muß dann die Resultante der teils gleichsinnigen, teils gegensätzlichen Erregungen der Zwischensubstanzen sein.

Wenn man nunmehr die hormonale Zusammensetzung des Milieus ändert, z. B. durch Zufügung von Adrenalin, Acetylcholin oder ähnlichen Substanzen, dann kann die Erregbarkeit der Muskelzellen geändert werden einmal durch Reizung oder Lähmung der intramuralen Ganglienzellen oder der sich an die Zwischensubstanz anlagernden Nervenendigungen oder durch eine Wirkung dieser Pharmaka auf die Zwischensubstanz selbst, oder endlich durch eine Beeinflussung der eigentlichen Substanz der Muskelzelle.

Bei solchen Versuchen sieht man nun, daß Acetylcholin und Pilocarpinzusatz zur Ringerlösung regelmäßig den Tonus steigern, während bei Adrenalinzusatz in weitgehender Unabhängigkeit von der Dosierung bald eine Tonussteigerung, in der Mehrzahl der Fälle aber eine Tonusverminderung Platz greift. Dieser wechselnde Ausfall der Adrenalinversuche wird verständlich, wenn wir die begründete Annahme machen, daß am ausgeschnittenen Darme die überwiegende zentrale physiologische sympathische Hemmung fehlt, und daß dadurch am ausgeschnittenen Präparat die hemmende Wirkung der ihr dienenden sympathischen Zwischensubstanz eine besonders starke Beeinträchtigung erfahren hat, so daß unter der weiteren Voraussetzung, die in den sympathischen Zwischensubstanzen den vorzüglichsten Angriffspunkt des Adrenalins postuliert, nunmehr je nach dem zufälligen, durch das Milieu bedingten Erregungszustand bei den sympathischen Zwischensubstanzen oder der Muskelzelle selbst, wie auch je nach dem zufälligen Erregungszustande der parasympathischen Zwischensubstanz das Adrenalin bald an der einen, bald an der anderen sympathischen Zwischensubstanz durch Additionswirkung eine stärkere Erregung auslöst, die sich dann in einer Tonussteigerung oder einer Tonusverminderung ausdrückt.

Dieser wechselnde Ausfall der Adrenalinwirkung am ausgeschnittenen Meerschweinchendarm wird auch durch einige Versuche illustriert, die ich in meiner vorliegenden Arbeit mitteilte.

Dazu liegen folgende Beobachtungen in der Literatur vor: *Magnus* (4) sah am ausgeschnittenen Darmpräparat nach Adrenalinreizung gewöhnlich

Tonushemmung, ausnahmsweise Steigerung. Am ausgeschnittenen Froschmagen stellte *Boruttau* (5) und *Oskar B. Meyer* (6) eine Tonussenkung fest, *Boenheim* (7) sah sie nur am unversehrten Tiere; am ausgeschnittenen Froschmagen sah er nur die Tonussteigerung. *Bunch* (8) und *Salvioli* (9) sahen Tonussteigerung. Am Verdauungskanal in situ im Tierkörper fanden ferner *Magnus* gelegentlich Tonuserregung des Darms, *Katsch* (10) am Bauchfensterkaninchen gewöhnlich Hemmung am Darme, manchmal auch Erregung. Bei röntgenologischer Beobachtung am Menschen beobachtete *Katsch* nach Adrenalin bald Tonussteigerung, bald Tonushemmung, *Watanabe* (11) sah am Hundemagen mit Hilfe der röntgenologischen Beobachtung in geeigneten Fällen nach Adrenalin eine initiale Tonussteigerung mit nachfolgender Senkung.

Weiterhin wird es klar, daß nach einer Änderung der hormonalen Beschaffenheit des Milieus, also z. B. nach dem Zusatz von Acetylcholin und durch die dadurch außerordentlich gesteigerte Erregung der parasympathischen Zwischensubstanz (wahrscheinlich vom Nervenende aus) die Adrenalinwirkung auf die dem Parasympathicus antagonistische sympathische Zwischensubstanz nicht zur Anschauung kommt, sondern daß die dem Parasympathicus gleichsinnig wirkende sympathische Innervationskomponente, die ja ebenfalls durch Adrenalin, wie wir annehmen, erregt wird, den überwiegenden Einfluß ausübt, so daß dadurch scheinbar parasympathische Adrenalinwirkungen, nämlich eine regelmäßige Tonussteigerung, zustande kommen. In dieser Weise ließen sich z. B. wohl die hierher gehörigen Beobachtungen von *Kolm* und *Pick* (12) am Kaninchendarm erklären, die zeigen, daß der durch Acetylcholin behandelte Darm nach Adrenalinzusatz oft nach einem vorübergehenden Tonusabfall eine starke Tonussteigerung erfährt, die die durch Acetylcholin allein bedingte Steigerung übertrifft. Atropin hebt diese Tonussteigerung offenbar durch Dämpfung der Acetylcholinwirkung, wie wir uns vorstellen, auf.

Endlich muß auch eine Änderung in der Ionenmischung des Milieus, also beim ausgeschnittenen Magen-Darmpräparat eine Änderung in der Zusammensetzung der *Ringer*schen Flüssigkeit den Tonus beeinflussen, sei es durch Wirkung auf die Nervenendigungen, die Zwischensubstanz oder die Muskelzelle selbst.

So fanden *Tetzner* und *Turold* (13), daß Ca-Zusatz zur Ringerlösung die Magenbewegungen hemmt, und daß diese Hemmung durch Acetylcholin und $BaCl_2$ durchbrochen wird. Kalium hat eine entgegengesetzte Wirkung. In derselben Richtung liegen die Beobachtungen von *Zondek* (14), der dem Parasympathicus und Sympathicus die Aufgabe zumißt, die Ionenwanderung an und in der Zelle zu dirigieren und eine Konzentrationsänderung der Elektrolyte herbeizuführen, d. h. sie dorthin zu schaffen, wo es nötig ist, um die physiologischen Veränderungen in der Zelle, also in dem vorliegenden Falle im Kontraktionszustand der Muskulatur zu ermöglichen. Nicht die Elektrolyte reizen die vegetativen Nerven, so meint *Zondek*, und die Zwischensubstanzen, sondern umgekehrt, die

Nerven dirigieren die Elektrolyte, und diese bahnen in der Zelle den Weg, auf dem die Nerven ihre Wirkung ausüben können. Denn anderenfalls müßte z. B. die Kaliumwirkung nach Lähmung der parasympathischen Apparatur durch Atropin aufgehoben werden, was nicht der Fall ist. Auf gleicher Linie bewegen sich endlich die Beobachtungen von *Jendrassik* (15), wie von *Froboese* (16), der am Froschmagen bei Steigerung der Kaliumkonzentration eine erregende Wirkung fand, mit der Einschränkung, daß in beiden Fällen sehr große Dosen eine Lähmung verursachen. Endlich sind in diesem Zusammenhang die ausführlichen Untersuchungen von *M. Rosemann* (17) zu nennen, der am Dünndarm von Frosch und Ratte arbeitete. Er fand, daß bei Abwesenheit von Ca in der Ringerlösung schon ein kleiner Überschuß von K lähmend auf die Pendelbewegungen und den Tonus wirkt. Bei Anwesenheit von Ca und Fehlen von K wirkt der Zusatz kleiner K-Mengen hemmend auf Rhythmik und Tonus, während Zusatz von mittleren Mengen K den umgekehrten Effekt hat, indessen der Zusatz von noch größeren Mengen K wieder ryhthmik- und tonussteigernd wirkt. Bei der Abwesenheit von K in der Ringerlösung bewirken Ca-Dosen, die den normalen Ca-Gehalt um ein Vielfaches übertreffen, eine Tonussteigerung. Erst ganz hohe Ca-Dosen senken in diesem Falle den Tonus. Bei Anwesenheit von K machen auch kleinere Ca-Dosen (bis zum 2,5fachen der normalen) eine Tonussteigerung. Bei Anwesenheit von K bewirken größere Ca-Dosen dagegen eine Tonussenkung. Es ist auch nach *Rosemann* für die Wirkungsart der Ca- und K-Ionen hauptsächlich das Verhältnis beider Ionen zueinander und nicht deren absolute Konzentration in der Lösung maßgebend.

Wie dem nun sei, ob die Nerven die Ionenwanderung in der Zelle dirigieren, oder ob die Ionen die Nerven und Zwischensubstanzen erregen, oder ob beide Vorgänge, was wohl am wahrscheinlichsten ist, nebeneinander hergehen, *es lehren alle diese Versuche, daß eine Änderung in der Ionenmischung des Milieus auch Änderungen im Tonus der Muskulatur nach sich zieht*, und daß die Anreicherung der normalen Ringerlösung mit Kalium im allgemeinen Wirkungen ausübt, die denen einer Parasympathicusreizung entsprechen, während Anreicherung mit Ca Effekte auslöst, die der Erregung des hemmenden Sympathicus analog sind. Aber diese Wirkungen sind durchaus an die Dosierung dieser Substanzen geknüpft. Bei Änderung der Dosierung ändern sich auch die Effekte, und es ist insbesondere beachtenswert, daß Zusatz kleinerer und mittlerer Ca-Mengen zur normalen Ringerlösung tonussteigernd, größerer Ca-Mengen aber tonussenkend wirkt. Genau wie beim Adrenalin tritt auch hier eine verschiedene Wirkung des sympathicotropen Calciums auf den Tonus zutage.

Es ist vorläufig noch nicht möglich, von einem einheitlichen Gesichtspunkte aus eine Deutung der verwirrenden Fülle an Einzelbeobachtungen, die zu diesem Gegenstande in der Literatur vorliegen, zu geben. Es ist auch nicht möglich, die an dem gleichen Organ bei verschiedenen Tieren gewonnenen Beobachtungen auf eine gemeinsame Plattform zu bringen, da die Innervationsverhältnisse, zum mindesten des Magens,

bei den verschiedenen Tieren in quantitativer Beziehung nicht ganz identisch zu sein scheinen.

Wir müssen uns mit der allgemeinen Feststellung begnügen, daß alle diese Beobachtungen uns kennengelehrt haben, eine Änderung in der Ionenmischung des Milieus bedinge Änderungen im Tonus der glatten Muskulatur.

Viel genauer sind wir, wie wir sahen, unterrichtet über die Folge der Änderung der hormonalen Beschaffenheit des Milieus auf den Tonus. Hier haben wir feste Stützpunkte gewonnen, und die theoretische Ausdeutung der experimentellen Erfahrungen kann heute schon in weitaus befriedigenderer Weise vorgenommen werden. Nun können wir uns die Frage vorlegen, wie eine Änderung der Ionenmischung des Milieus die Wirkung der hormonalen Substanzen auf den Tonus modifiziert, deren Wirkung wir bei normaler Ionenmischung genau kennen.

Am Herzen ist diese Frage mehrfach studiert worden. Ich verweise auf die Arbeiten von *Kolm* und *Pick* (12), wie von *Burridge* (18). Am Magen-Darmtraktus liegen nur wenige Beobachtungen vor. *Rosemann* (17) fand am Frosch- und Rattendarm, daß Ergotoxin bei K-freier Ringerlösung tonussteigernd wirkt, bei Ca-freier Ringerlösung aber tonussenkend. Pilocarpin ist auch bei Ca-Mangel wirksam. Ferner sah er folgendes: Wenn zu einem in Ca-freier Ringerlösung suspendierten Darm Adrenalin zugefügt wird, so entsteht auf Ca-Zusatz nicht wie gewöhnlich (scilicet bei Abwesenheit von Adrenalin) bei der betreffenden Ca-Dosis eine Tonussteigerung, sondern eine Tonussenkung. Es resultiert also aus der Addition von Adrenalin und Ca eine offenbar sympathische Hemmungswirkung. Wird aber die Adrenalinwirkung durch K- und Ergotoxin aufgehoben, so tritt auf Ca-Zusatz bei derselben Dosierung eine Tonussteigerung auf. *Tetzner* und *Turold* (13) arbeiteten am menschlichen Magen. Sie studierten vorzüglich den Einfluß einer Ca- oder K-reichen und einer Ca- und K-freien Ringerlösung auf die Wirkung von Adrenalin und Acetylcholin. Das Ergebnis war folgendes: In Ca-reicher Ringerlösung tritt Verstärkung der hemmenden Adrenalinwirkung auf, die von Acetylcholin und $BaCl_2$ durchbrochen wird. Durch K-reiche Ringerlösung wird die hemmende Adrenalinwirkung abgeschwächt, die Acetylcholinwirkung wird nicht nachweislich beeinflußt. In der Ca-freien Ringerlösung wird die hemmende Adrenalinwirkung, wie auch die erregungssteigernde Acetylcholinwirkung abgeschwächt, während die K-freie Ringerlösung die hemmende Adrenalinwirkung wie die erregende Acetylcholinwirkung verstärkt.

An diese Beobachtungen knüpfen meine Versuche an. Meine Fragestellung lautete: Wie wird am überlebenden Darm durch Mangel an K oder Ca in der Ringerlösung die Wirkung von Acetylcholin, Pilocarpin und Adrenalin beeinflußt? Meine Versuchstiere waren Meerschweinchen.

Ich fasse das Ergebnis meiner Versuche hier zusammen.

1. Acetylcholin und Pilocarpin bewirken bei normaler Ringerlösung eine Tonussteigerung, die bei Acetylcholin beträchtlicher ist, als bei Pilocarpin.

2. Adrenalin erzeugt bei normaler Ringerlösung und gleicher Dosierung an einzelnen Därmen eine Tonussenkung, an anderen eine Tonussteigerung, die aber geringer ist als die Tonussteigerung nach Acetylcholin oder Pilocarpin. Mitunter sieht man auch an ein und demselben Darmpräparat, daß eine größere Adrenalindosis eine Tonussenkung, eine geringere aber eine Tonussteigerung macht. In wieder anderen Fällen bewirkt eine bestimmte Adrenalindosis nach initialer, ziemlich kräftiger Tonussteigerung eine sehr starke Tonussenkung.

3. In der Ca-freien Ringerlösung ist die Acetylcholinwirkung stark herabgesetzt, die Pilocarpinwirkung kann überhaupt ausbleiben, die tonussteigernde und die tonussenkende Adrenalinwirkung sind stark abgeschwächt.

4. In der K-freien Ringerlösung ist bei ungefähr normaler Kontraktionshöhe die Acetylcholinkontraktion hinsichtlich der Dauer der Kontraktion außerordentlich verlängert, die Pilocarpinwirkung zeigt entweder eine verstärkte Tonussteigerung oder eine Vermehrung der Zahl und der Höhe der Einzelkontraktionen. Die Adrenalinwirkung scheint nicht verändert zu sein; denn wenn ein Darmpräparat in normaler Ringerlösung auf eine bestimmte Adrenalindosis eine Tonussteigerung zeigte, so zeigte es sie auch und in ungefähr gleichem Umfange in der K-freien Ringerlösung bei gleicher Adrenalindosis; dasselbe gilt auch für den Fall, daß Adrenalin an einem Präparat die Tonussenkung machte.

Diese Versuche, die das Studium der Modifikation der Wirkung der parasympathico- und sympathicotropen Pharmaka auf den Tonus der Muskelzelle in Abhängigkeit von der Ionenmischung des Milieus zum Vorwurf haben, stehen in enger Beziehung zu denjenigen, bei denen die Modifikation des Reizungseffektes der einzelnen vegetativen Nerven auf die Muskulatur bei Änderungen der Ionenmischung des Milieus festgestellt wird. Das ist bisher vorzüglich am Herzen studiert worden. So fand *Fr. Kraus* (19), dem wir eine Reihe glänzender Untersuchungen zu den uns hier beschäftigenden Fragen verdanken, daß nach einer Vorbehandlung mit Calcium die elektrische Vagusreizung keine Hemmung, sondern eine Erregung des Herzens bewirkt. Andererseits fanden *Spiro* (20), *Chiari* und *Fröhlich* (21) am Herzen, und *Tetzner* und *Turold* (13) am Darme, daß bei Ca-Mangel die Vagusreizung erfolglos ist. Das letztere stimmt mit meinen Beobachtungen durchaus überein. Denn auch ich sah am Darme, daß in Ca-freier Ringerlösung die Wirkung der parasympathicotropen Reizmittel Acetylcholin und Pilocarpin stark gedämpft ist.

Mit wenigen Worten sei hier noch auf die theoretische Ausdeutung meiner Versuchsergebnisse eingegangen. Über den wechselnden Ausfall der Adrenalinwirkung am ausgeschnittenen Darm in normaler Ringer-

lösung wurde oben schon das Nötige gesagt. Besonders möchte ich dazu noch hervorheben, daß genau, wie ich es in meinen Versuchen gelegentlich sah, auch am Magen des Hundes nach *Watanabes* (11) Beobachtungen aus dem hiesigen Laboratorium, und zwar bei normalem Tiere, bei dem der Magen röntgenologisch beobachtet wird, Adrenalininjektion häufig zunächst eine Tonussteigerung und dann erst die Tonussenkung macht. Auch der Versuche von *Suda* (22), *Kuroda* (23) und *Mitsuda* (24) aus unserem Laboratorium sei hier gedacht, die zeigen, daß Magen- und Darmabschnitte des Hundes nach voraufgegangener Degeneration der sämtlichen extramuralen Nerven im ausgeschnittenen, in Ringerlösung suspendierten Präparate auf Adrenalin nur mit einer Tonussteigerung reagierten, während die Kontrollpräparate von demselben Tier, bei denen keine Degeneration der extramuralen Nerven voraufgegangen war, bei identischer Behandlung mit Adrenalin eine Tonussenkung aufwiesen oder eine Tonussteigerung nicht in gleichem Umfange erkennen ließen.

Durch die voraufgegangene Nervendegeneration entbehren jene Präparate die funktionstüchtigen intramuralen Endigungen der extramuralen Nerven, die die Kontrollpräparate noch besitzen. Im ausgeschnittenen Ringerpräparat verfügt also das Adrenalin im letzteren Falle über mehr Angriffspunkte als im ersteren Falle. Es kann am Präparat mit nicht degenerierten Nerven speziell auch die Endigungen der extramuralen sympathischen Hemmungsnerven stark erregen, also die Bahn der besonders stark wirkenden zentralen sympathischen Hemmung, dergegenüber schon in der Norm der Einfluß der Bahn der zentralen sympathischen Erregung in den Hintergrund tritt. So scheint alles dafür zu sprechen, daß die Hemmung überhaupt, wie es auch *Boenheim* (l. c.) annimmt, am Magen und Darme in erster Linie zentralen Ursprungs ist, und daß diese zentrale Hemmungswirkung um so unvollkommener durch Reizung der intramuralen sympathischen Gebilde durch Adrenalin ersetzt werden kann, je vollkommener die Ausschaltung der extramuralen sympathischen Hemmungsbahn ist. Am ausgeschnittenen Magen-Darmstück ist sie nur durchschnitten, am ausgeschnittenen Magen-Darmstück mit voraufgegangener Degeneration aber ist sie vollkommen vernichtet. Hier kann es nur noch intramurale sympathische Ganglienzellen nebst ihren Nerven zur Muskelzelle geben, die hemmend wirken. Darum zeigt das Darmstück mit degenerierten extramuralen Nerven auf Adrenalinreizung vorzüglich die Tonussteigerung, das andere aber vorzüglich die Hemmung oder Erregung mit nachfolgender Hemmung oder in manchen Fällen auch nur die Erregung. Dazu ist noch zu sagen, daß das Adrenalin sicherlich neben der Zwischensubstanz auch auf die Nervenendigungen wirken dürfte, und daß eine Reizung dieser, wo sie vor-

handen sind, auch die Erregung der durch Adrenalin gleichzeitig gereizten Zwischensubstanz noch entsprechend verstärken muß.

Warum wird nun in der Ca-freien Ringerlösung die Wirkung von Acetylcholin, Pilocarpin und Adrenalin abgeschwächt, und zwar am Magen und Darm, wie aus meinen Versuchen am Darm und denen von *Tetzner* und *Turold* am Magen klar hervorgeht? Die Auswirkung der parasympathischen, wie beider Arten der sympathischen Erregung, wird durch den Ca-Mangel verhindert.

Auf der einen Seite sehen wir, daß Ca-Überschuß im wesentlichen die Reaktionen auslöst, die einer Sympathicusreizung entsprechen (*Zondek* u. a.), also in einseitiger Weise mit der Sympathicuswirkung in Beziehung zu stehen scheint. Auf der anderen Seite sehen wir, daß Ca-Mangel die Wirkungen beider Nervensysteme beeinträchtigt, woraus jedenfalls folgt, daß das Ca für die Wirkung beider Systeme notwendig ist. Man könnte sich vorstellen, daß, wie *Zondek* meint, das Ca in positiver Weise die Bedingungen für die sympathische Nervenwirkung in der Muskelzelle setzt, daß aber der Ca-Mangel verhindert, daß das K und Na die für das Zustandekommen der parasympathischen Nervenwirkungen erforderlichen Bedingungen in der Zelle herbeiführen. Es könnte die Konzentrierung von K und Na in einer bestimmten Richtung in der Zelle von dem diesen beiden Ionen antagonistischen Ca mit abhängig sein.

Warum aber bewirkt dann der K-Mangel eine Steigerung der Wirkung der parasympathischen Erregung, vielleicht auch der sympathischen Erregung, wie es *Tetzner* mit *Turold* am Magen sahen, ich es am Darme allerdings nicht finden konnte? In der K-freien Ringerlösung ist noch die andere Komponente erhalten, die mit dem K vielfach in ihrer Wirkung Hand in Hand geht, nämlich das Na. Bei Reizungen mit Na entspricht nach *Zondek* (14) der Reizungseffekt gewöhnlich einer abgeschwächten Parasympathicusreizung. Es müßte der K-Mangel also eigentlich eine Herabsetzung in der Wirkung der parasympathischen Reizung machen.

Da er aber das genaue Gegenteil hervorruft, muß durch den K-Mangel das Milieu für die parasympathische Erregung günstiger gestaltet werden. Das kann einmal geschehen durch den relativen Überschuß von Ca, und zwar in der vorhin besprochenen Weise, nur daß das Ca jetzt richtungsgebend auf das Na wirkt. Es würde also bei K-Mangel die Na-Wirkung überwiegen, sie würde aber auch in positiver Weise für die Auswirkung der parasympathischen Erregung günstigere Bedingungen schaffen können, wenn das K auch in einem gewissen Gegensatz zu dem Na-Ion gestanden hätte, was wohl anzunehmen ist, obschon beide die Parasympathicuswirkung doch im Grunde begünstigen. So würden wir verstehen, warum in der K-freien

Ringerlösung die Parasympathicuswirkung gesteigert ist; sie wäre es wegen der durch den K-Mangel verstärkten Na-Wirkung und der verstärkten Na-Direktion durch den relativen Ca-Überschuß. Wegen des Fehlens des einen Ca-Antagonisten, nämlich des K in dieser Lösung, ist es verständlich, warum unter Umständen auch die sympathische Wirkung verstärkt sein kann, wie es *Tetzner* und *Turold* am Magen sahen.

Es würde also in der K-freien Lösung das Fehlen des einen Antagonisten zum Ca und Na, nämlich des K, gerade das Umgekehrte bewirken, wie das Fehlen des Ca in der Ca-freien Lösung, nämlich nicht wie in dieser letzteren eine Hemmung in der Konzentration der übrigen beiden Ionen in einer bestimmten Richtung, sondern eine Förderung in diesen Vorgängen. Mit anderen Worten: das Ca dirigiert durch seinen Antagonismus gleichsinnig richtungsgebend mit der parasympathischen Wirkung das Na und K, ohne selbst Träger dieser Wirkung zu werden; das K wirkt der durch die parasympathische oder sympathische Reizung ausgelösten Wanderung von Na bzw. Ca entgegen und hemmt so die Wirkungen beider nervöser Systeme. Beim Ca-Überschuß muß folglich je nach der Größe dieses Überschusses entweder eine Begünstigung seiner richtungsgebenden Wirkung auf die K- und Na-Ionen auf Grund seiner, diesen antagonistischen Eigenschaften eintreten, also eine Begünstigung der parasympathischen Wirkung zustande kommen, oder aber eine Begünstigung der tonussteigernden oder tonushemmenden Sympathicuswirkung entstehen infolge der positiven Wegbahnung für diese durch es selbst. Bei K-Überschuß aber muß sich entweder sowohl bei der parasympathischen, wie auch bei der sympathischen Wirkung eine Bremsung in der dabei auftretenden Wanderung der Ca- und Na-Ionen zeigen, also eine Herabsetzung beider Wirkungen eintreten, oder aber eine Steigerung der parasympathischen Wirkung durch positive Wegbahnung durch es selbst für dasselbe entstehen.

Mit diesen Schlußfolgerungen gehen auch die Anschauungen von *Rosemann* insofern konform, als dieser den K- und Ca-Ionen sowohl tonussteigernde wie tonusherabsetzende Wirkungen zuerkennt, die von den gegenseitigen Mischungsverhältnissen der beiden Ionen im Milieu abhängig sind.

Es wird noch vieler Arbeit bedürfen, bis wir in diesen außerordentlich verwickelten Verhältnissen klar sehen. So beanspruchen auch meine theoretischen Ausführungen nur den Wert eines Versuches, für die von mir beobachteten Erscheinungen das Verständnis anzubahnen.

Experimenteller Teil.

Die Meerschweinchen wurden durch Nackenschlag getötet, dann wurde ein etwa 5 cm langes Stück des Dünndarms herausgeschnitten und in das mit Ringerlösung von 37° C beschickte, 80 ccm fassende Glasgefäß gebracht und in der üblichen Weise an einem Ende fixiert und am anderen

Ende mit der Fadenklemme des *Engelmann*schen Herzhebels verbunden. Durch die Ringerlösung perlte dauernd Sauerstoff aus einer Bombe. Die Ringerlösung in dem Gefäß konnte durch entsprechende Zu- und Abflußeinrichtungen leicht gewechselt werden. Die Zusammensetzung der verwandten Lösungen war folgende:

1. Normale Ringerlösung		2. Ca-freie Ringerlösung		3. K-freie Ringerlösung	
NaCl	7,5	NaCl	7,5	NaCl	7,5
KCl	1,0	KCl	1,0	$CaCl_2$	2,0
$CaCl_2$	2,0	Aqua dest. ad	1000	Aqua dest. ad	1000
Aqua dest. ad .	1000				

I. Versuche über die wechselnde Adrenalinwirkung auf den in normaler Ringerlösung suspendierten Darm.

Im ganzen wurden fünf Meerschweinchen untersucht. Mitunter wurde dasselbe Darmstück nach Auswaschen mit warmer Ringerlösung zu mehreren Versuchen benutzt.

Tabelle I.

Tier Nr.	Darmstück Nr.	Adrenalindosierung Zusatz der Lösung zu 80 ccm Ringerlösung ccm		Erfolg		Initiale Tonussteigerung mit folgender Tonussenkung
		1/1000	1/10000	Tonussenkung	Tonussteigerung	
1	1	1		++		
1	1		5		+	
1	1		7		+	
2	1		0,5	+		
2	1		1		+	
2	1		2		+	
2	1		3		+	
2	2		0,5		++	
2	2	1		+		
2	2	2		+		
2	3		1			++
2	3		2			+
2	3		5		+++	
3	1	1		++		
3	1		1	+		
3	2		1		+	
3	3		1		+	
3	3	1			+++	
3	3		2		++	
3	4	1			+	
3	4		1		+	
3	4		2		+	
3	4		3		+ ·	
3	4		5	0	0	
3	4		0,5	0	0	
4	1		0,5		+	
4	1		1		+	
4	1		2		+	
4	1		3		+	
4	1		4		+	
4	1		5		+	
4	1	1			+	
5	1		2	+		

II. Versuche über die Adrenalinwirkung auf den in normaler, Ca-freier oder K-freier Ringerlösung suspendierten Darm.

Bei diesen Versuchen wurde ein und dasselbe Darmstück sowohl in normaler, wie in Ca-freier, wie endlich in K-freier Ringerlösung auf seine Reaktion gegen stets die gleiche Adrenalindosis untersucht. Die Reihenfolge der Versuche wurde so gewechselt, daß bald primo loco die normale oder eine der nicht normalen Ringerlösungen angewendet wurden und dann die beiden übrigen Lösungen in ebenfalls wechselnder Reihenfolge herangezogen wurden. Immer wurde das betreffende Darmstück zwischen je zwei Versuchen mit der in dem folgenden Versuch zu verwendenden Lösung, die ebenfalls auf 37° C erwärmt war, sorgfältig ausgewaschen.

Tabelle II.

Tier Nr.	Darmstück Nr.	Adrenalindosierung Zusatz der Lösung zu 80 ccm der betreffenden Ringerlösung ccm		Ringerlösung			Erfolg	
		1/1000	1/10000	normal	Ca··-frei	K·-frei	Tonussenkung	Tonussteigerung
1	1		2	+				+
1	1		2		+		0	0
1	1		2			+	0	0
1	1		5	+				+
1	1		5		+		0	0
1	1		5			+		+
1	2		2		+		0	0
1	2		2			+		++
1	2		2	+				++
1	2		2		+		0	0
2	1		1		+		+	
2	1		1	+			++	
2	2	1		+			+	
2	2	1				+	+	
2	2	1			+		0	0
3	1		3		+		0	0
3	1		3			+	+	
3	1		3	+			0	0
3	1		5		+		0	0
3	1		5			+	+	
3	1		5	+			+	
3	2		1	+			+	
3	2		1			+	++	
3	2		2	+			+	
3	2		2			+	+	
4	1		1			+	++	
4	1		1		+		+	
4	1		1	+			++	
4	2		1			+		+++
4	2		1		+			
4	2		1	+				++

III. Versuche über die Acetylcholinwirkung auf den in normaler, Ca-freier oder K-freier Ringerlösung suspendierten Darm.

Die Acetylcholinlösung wurde immer frisch hergestellt. Im übrigen war die Versuchsanordnung wie bei der Gruppe II.

Tabelle III.

Tier Nr.	Darmstück Nr.	Acetylcholindosierung Zusatz der Lösung zu 80 ccm d. betreffenden Ringerlösung ccm		Ringerlösung					Erfolg Tonussteigerung
		1/1000	1/10000	normal	Ca··-frei	K·-frei	n/2 1/2 Ca··-frei	n/2 1/2 K-frei	
1	1	1		+					+
2	1		0,4	+					+
2	1		0,5	+					+
2	1		0,5	+					+
3	1		1	+					+++
3	1		0,1	+					0
3	1		0,2	+					++
3	1		0,5	+					+++
3	1		1			+			++
3	1		0,1			+			+
3	1		0,5			+			+
4	1		0,5		+				+
4	1		0,5		+				+
4	1		0,5	+					++
4	1		0,5		+				++
4	2		0,5		+				+
4	2		0,5		+				+
4	2		0,5	+					++
4	2		0,5	+					++
4	2		0,5				+		++
4	2		0,5				+		+
4	2		0,5	+					+
4	2		1		+				0
4	2		1			+			+
4	2		1	+					+
5	1		0,5			+			++
5	1		0,5		+				+
5	1		0,5	+					+
5	2		0,5		+				+
5	2		0,5			+			+++
5	2		0,5	+					+++
5	2		0,5		+				+
5	2		0,5			+			+++
5	3		1		+				+
5	3		1			+			++
5	3		1	+					++
5	3		0,5		+				0
5	3		0,5			+			+
5	3		0,5	+					+
5	4		0,5		+				+
5	4		0,5			+			++
5	4		0,5	+					++
5	5		0,5		+				+
5	5		0,5			+			++
5	5		0,5	+					++
5	5		0,2		+				+
5	5		0,2			+			++
5	5		0,2	+					++
6	1		0,5				+		+
6	1		0,5					+	++

Tabelle III. (Fortsetzung.)

Tier Nr.	Darmstück Nr.	Acetylcholindosierung Zusatz der Lösung zu 80 ccm d. betreffenden Ringerlösung ccm		Ringerlösung					Erfolg Tonussteigerung
		1/1000	1/10 000	normal	Ca··-frei	K·-frei	n/2 1/2 Ca··-frei	n/2 1/2 K-frei	
6	1		0,5	+					++
7	1		0,5		+				+
7	1		0,5				+		+
7	1		0,5			+			++
7	1		0,5					+	++
7	1		0,5	+					+
7	2		0,5		+				+
7	2		0,5				+		++
7	2		0,5			+			+++
7	2		0,5	+					+++
7	2		0,5					+	+++
7	2		0,5				+		++
7	2		0,5		+				+

IV. Versuche über die Pilocarpinwirkung auf den in normaler, Ca-freier oder K-freier Ringerlösung suspendierten Darm.

Die Versuchsanordnung war wie in der Gruppe II.

Tabelle IV.

Tier Nr.	Darmstück Nr.	Pilocarpindosierung Zusatz der Lösung zu 80 ccm der betreffenden Ringerlösung ccm		Ringerlösung			Erfolg T = Steigerung normaler Kontraktionen + = Tonussteigerung
		1/1000	1/10 000	normal	Ca··-frei	K·-frei	
1	1		1	+			+
1	1		1		+		0
1	1		1			+	+
1	2		2	+			+++
1	2		2			+	T T T
1	2		2		+		0
1	3		1	+			+
1	3		1		+		+
2	1		2			+	++
2	1		2		+		0
2	1		2	+			?
2	1		2		+		0
2	2	1		+			+
2	2	1			+		0
2	2	1				+	T
2	2	1				+	T
3	1		1		+		0
3	1		1	+			+
3	1		1			+	T T
3	1		1		+		0
4	1		0,5			+	+++
4	1		0,5		+		++
4	1		0,5	+			Tonussenkung
4	2		0,3	+			+
4	2		0,3		+		0
4	2		0,3			+	T T
4	2	1		+			++
4	2	1			+		0
4	2	1				+	++

Literatur.

1) *A. Bickel*, Festschrift zum 75. Geburtstage von Prof. *Pawlow*. Leningrad 1924. — 2) *Pal*, Arch. f. Verdauungskrankh. **5**, 1899. — 3) *Courtade* und *Guyon*, Arch. de Physiol. normale et pathol. 1897, S. 880. — 4) *Magnus*. Ergebn. der Physiol. von *Asher* und *Spiro* **2**, 1903; **7**, 1908. — 5) *Boruttau*. Pflügers Arch. **76**, 1899. — 6) *Oskar B. Meyer*, Zeitschr. f. Biol. **48**, 1890. — 7) *Boenheim*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **32**, 1923. — 8) *Bunch*, Journ. of physiol. **22**, 1898. — 9) *Salvioli*, Arch. ital. de Biol. **37**, 1902. — 10) *Katsch*. Zeitschr. d. exper. Path. u. Therap. **12**, 1913; Fortschr. a. d. Geb. d. Röntgenstrahlen **21**. — 11) *Watanabe*, Virchows Arch. **251**, 1924. — 12) *Kolm* und *Pick*, Pflügers Arch. **184**, 1920; **189**, 1921; **190**, 1921. — 13) *Tetzner* und *Turold*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **24**. — 14) *S. G. Zondek*, Deutsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 50; diese Zeitschr. **142**, 1922; **121**, 1921. — 15) *Jendrassik*, diese Zeitschr. **148**, 116, 1924. — 16) *Froboese*, Zeitschr. f. Biol. **70**. — 17) *Rosemann*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **29**, 1922. — 18) *Burridge*, Arch. internat. de pharmakodyn et de Thérapie **27**, 1922. — 19) *Fr. Kraus*, Deutsch. med. Wochenschr. 1920, S. 201; *Kraus* und *Zondek*. ebendaselbst 1921, Nr. 50; Klin. Wochenschr. 1. Jahrg., Nr. 20, S. 996. — 20) *Spiro*, Schweiz. med. Wochenschr. **20**, 1921. — 21) *Chiari* und *Fröhlich*. Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **66**, 1911. — 22) *Suda*, Virchows Arch. **251**, 1924. — 23) *Kuroda*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **31**, 1924. — 24) *Mitsuda*, ebendaselbst **31**, 1924. — Ferner wurden benutzt: 25) *Guggenheim* und *Löffler*, diese Zeitschr. **74**, 208, 1916. — 26) *Metzner*, Jahresber. f. d. ges. Physiol. 1920. — 27) *v. Fürst*, Asher-Spiro **17**, 1919.

Beiträge zur Kenntnis der bakteriellen Gärungen, insbesondere in der Koli-Typhusgruppe.

Von

W. C. de Graaff und **A. J. Le Fèvre.**

[Aus der mikrobiologischen Abteilung des pharmazeutischen Instituts der Reichsuniversität in Utrecht (Holland).]

(Eingegangen am 31. Dezember 1924.)

Die grundlegenden und erfolgreichen Untersuchungen von *Carl Neuberg* und seiner Schule haben dargetan, daß die sogenannte 3-Kohlenstoffhypothese für die alkoholische Gärung viel Anziehendes hat, obgleich es noch nicht gelungen ist, in allen Punkten durch das Experiment unwiderleglich die Richtigkeit dieser Auffassung zu begründen. Das Methylglyoxal in einer seiner isomeren Formen haben wir wohl als das wichtigste Zwischenprodukt der Zuckerspaltung zu betrachten, das, zu Brenztraubensäure sich umsetzend, als die Muttersubstanz der Kohlensäure und des Acetaldehyds gekennzeichnet ist.

Den organischen Zusammenhang von Acetaldehyd mit Brenztraubensäure hat *Neuberg* uns in treffender Weise dargetan, zunächst für die alkoholische Gärung. Wir erinnern an seine geistreiche Methode der Abfangung mittels sekundärer schwefligsaurer Salze[1]). Bald darauf hat *Neuberg* mit *Nord*[2]) die Zwischenstellung des Acetaldehyds auch für die bakteriellen Gärungen ermittelt. In der Arbeit von *Neuberg* und *Nord* handelt es sich um die Spaltung von Glucose, Mannit und Glycerin durch *Bact. coli*, *B. lactis aerogenes* und *B. dysenteriae*, in der Mitteilung von *Neuberg* und *Arinstein*[3]) um den Erreger der Buttersäuregärung, den *B. butyricus Fitz.* Nachher haben *Peterson* und *Fred*[4])

[1]) *C. Neuberg* und *E. Färber*, diese Zeitschr. **78**, 238, 1916; *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, ebendaselbst **89**, 389, 1918.

[2]) *C. Neuberg* und *F. F. Nord*, ebendaselbst **96**, 133, 1919.

[3]) *C. Neuberg* und *B. Arinstein*, ebendaselbst **117**, 269, 1920.

[4]) *W. H. Peterson* und *E. B. Fred*, Journ. of biol. Chem. **44**, 1920.

ebenfalls Acetaldehyd als Zwischenprodukt bei der Pentosengärung durch *Bact. acetoaethylicum* und *Lactobact. pentoaceticum* gefunden.

Durch diese Untersuchungen ist erwiesen, daß nicht nur bei Hefegärung, sondern auch bei Bakteriengärungen der Acetaldehyd und damit die Brenztraubensäure eine hervorragende Stellung während dieser Zersetzungen einnehmen, und daß es sich deshalb hier um nahe verwandte Erscheinungen handelt. Die außerordentliche Bedeutung dieser Entdeckungen tritt ins hellste Licht, wenn man nur bedenkt, daß es sehr wohl möglich ist, daß überhaupt die biochemische Zuckerspaltung auch im tierischen Organismus denselben oder doch einen ganz analogen Weg einschlägt. Wie anziehend die Darstellungen nach dieser Richtung auch sind, sie können bis jetzt nur als Hypothesen betrachtet werden, da die Experimente nur für einzelne Fälle die Richtigkeit dieses Gedankens angezeigt haben.

Es erschien uns deshalb erwünscht, die bakterielle Zuckerspaltung näher und ausführlich zu studieren, insbesondere die von *Kruse* so genannte gemischtsaure Gärung, welche unter Einwirkung von Organismen der Koli-Typhusgruppe zustande kommt, um damit zur allgemeinen Kenntnis des Gärungsproblems beizutragen. Schon der eine von uns hat eine ausführliche Arbeit veröffentlicht über die biochemischen Eigenschaften der Paratyphusbakterien und darin die Zersetzung der verschiedensten Zuckerarten und Zuckeralkohole studiert[1]). Es lag deshalb nahe, für die vorliegende Arbeit die Bakterien der Koli-Typhusgruppe zu wählen, und zwar nicht nur die verschiedenen Vertreter dieser Familie, sondern auch, soviel wie möglich war, verschiedene Stämme einer Art. So haben wir untersucht von *Bact. coli* (drei Stämme), *Bact. paratyphi B* (neun Stämme), *Bact. paratyphi A* (zwei Stämme), *Bact. typhi* (zwei Stämme), *Bact. dysenteriae Shiga-Kruse, Bact. dysenteriae Flexner, Bact. dysenteriae Hiss, Bact. dysenteriae Y* und *Bact. dysenteriae Strong* (von jedem einen Stamm).

Die Arbeit haben wir angefangen mit der Frage, welche Zuckerarten und welche Zuckeralkohole von diesen Bakterien zersetzt werden und welche Endprodukte dabei entstehen, d. h. wir prüften, ob hier Gas und Säure, oder nur Säure, oder weder Gas noch Säure auftreten. Weiter haben wir uns die Frage gestellt, ob und wann von diesen Organismen aus den genannten Stoffen Acetaldehyd erzeugt wird. Wir haben uns bei unseren Untersuchungen des Peptonwassers ohne Kochsalz als Nährboden bedient, haben uns jedoch durch Blankoproben überzeugt, daß aus dieser Lösung kein Gas, keine Säure und kein Acetaldehyd von keiner dieser Bakterien gebildet wird, so daß deshalb die entstandenen Produkte nur aus den zugesetzten Stoffen stammen.

---

[1]) *W. C. de Graaff*, Tydschr. v. vergel. Geneesk. 1917, 1918 u. 1919.

Die Anwesenheit des Acetaldehyds wurde nachgewiesen mittels des *Neuberg*schen Abfangverfahrens, wofür wir die nachfolgende Lösung herstellten:

Pepton „*Witte*"	1,0
Dinatriumsulfit	2,0
Calciumcarbonat	1,0
Wasser	100,0
Zucker bzw. Zuckeralkohol . . .	2,0

Die Peptonlösung wurde zunächst durch einmalige Erhitzung auf 100° C sterilisiert, am nächsten Tage wurden dann 2 g des zu untersuchenden Stoffes beigefügt und abermals eine halbe Stunde auf 100° C erhitzt. Bei alkaliempfindlichen Stoffen wurden das Peptonwasser und die Lösung der Substanz getrennt sterilisiert und nachher gemischt. Die folgenden Zuckerarten und Zuckeralkohole sind untersucht:

Tetrite: i-Erythrit.
Pentite: l-Arabit; i-Adonit.
Hexite: d-Mannit; d-Sorbit und i-Dulcit.
Hexosen: d-Mannose; d-Glucose; d-Galaktose; d-Fructose; l-Idose; l-Gulose.
Pentosen: l-Arabinose; l-Xylose; l-Rhamnose.
Disaccharide: Maltose; Lactose; Saccharose.
Trisaccharide: Raffinose.

Übersicht von der Zuckerspaltung durch Koli-Typhusorganismen.

	Bact. coli			Bact. paratyphi B			Bact. paratyphi A			Bact. typhi			Bact. dysenteriae *Sh. K.*		
	Gas	Säure	Acetaldehyd	Gas	Säure	Acetaldehyd	Gas	Säure	Acetaldehyd	Gas	Säure	Acetaldehyd	Gas	Säure	Acetaldehyd
i-Erythrit . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
l-Arabit	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
i-Adonit . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
d-Mannit . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—
d-Sorbit . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—
i-Dulcit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—
l-Arabinose . .	+	+	+	+	+	+	±	+	+	—	+	+	—	+	+
l-Xylose . . .	+	+	+	+	+	+	—	±	±	—	+	+	—	±	±
l-Rhamnose . .	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
d-Mannose . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+
d-Glucose . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+
d-Galaktose . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+
d-Fructose . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+
l-Idose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
l-Gulose . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—
Lactose	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Saccharose . .	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Raffinose . . .	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Einer von uns hat in seiner schon zitierten Arbeit die Vergärung der stereoisomeren Zuckerarten von Paratyphusbakterien studiert. Der Vollständigkeit wegen folgen die hierbei erzielten Resultate.

Stämme	l-Arabinose		d-Arabinose		d-Mannose		l-Mannose		d-Glukose		l-Glukose		l-Gulose		l-Idose	
	Gas	Säure	Gas	Säure	Gas	Säure	Gas	Säure	Gas	Säure	Gas	Säure	Gas	Säure	Gas	Säure
„Paratyphus A“:																
BrionKaiser.	—	+	±	+	±	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Buxton . . .	—	+	±	+	±	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Straßburg .	—	+	±	+	—	+			+	+	—	—	—	—	—	—
Longcope . .	—	+	±	+	—	+			+	+	—	—	—	—	—	—
„Paratyphus B“:																
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
„Aertryck“:																
Aertryck . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Lisse	+	+	+	+	+	+			+	+	—	—	—	—		
„Gärtner“:																
Gärtner . .	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Utrecht . . .	+	+			+	+			+	+	—	—	—	—	—	—
Meppel . . .	+	+			+	+			+	+	—	—	—	—	—	—
„Suipestifer“:																
1	+	+	+	+	+	+			+	+	—	—	—	—	—	—
2	+	+			+	+			+	+	—	—	—	—	—	—
„Typhi murium“:																
1	+	+			+	+			+	+	—	—	—	—	—	—

Hieraus ist leicht zu ersehen, daß der Paratyphus-A-Organismus weit empfindlicher für den inneren Bau des Zuckermoleküls ist als der verwandte B-Organismus, der sich in seinem Verhalten dem Kolibazillus am nächsten anschließt.

l-Xylose wird fast gar nicht vom A-Bazillus gespalten; die gleich gebauten Hexosen l-Glucose und l-Idose sind auch unvergärbar.

l-Arabinose wird wenig angegriffen; von den verwandten Hexosen l-Glucose und l-Mannose wird nur die letztgenannte zerlegt, während die erste resistent ist.

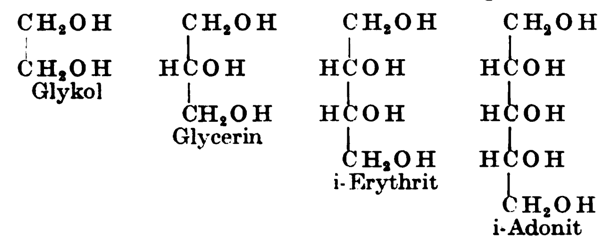
d-Arabinose vergärt unter Bildung von Gas und Säure, das gleiche wird bei d-Glucose und d-Mannose beobachtet.

Es ist deshalb nicht zu leugnen, daß die Konfiguration des Zuckermoleküls einen bedeutenden Einfluß auf die Gärungsfähigkeit der Kohlenhydrate ausübt.

Interessant ist auch das Verhalten der mehrwertigen Alkohole. Davon wurden von uns die nachfolgenden geprüft:

	Bact. coli	Bact. paratyphi B	Bact. paratyphi A	Bact. typhi	Bact. dysenteriae *Sh. K.*
Glykol	+	±	±	±	—
Glycerin	+	±	±	±	—
i-Erythrit	—	—	—	—	—
l-Arabit	—	—	—	—	—
i-Adonit	—	—	—	—	—
d-Mannit	+	+	+	nur Säure	—
d-Sorbit	+	+	+	"	—
i-Dulcit	+	+	+	"	—

Von diesen Alkoholen werden also nicht vergoren:



Die Hexite werden dagegen alle zerlegt, nur ist dabei zu bemerken, daß i-Dulcit ein wenig widerstandsfähiger ist als d-Mannit und d-Sorbit, wenigstens gegenüber dem Paratyphusbazillus A. Im Anschluß daran erweist sich auch d-Galaktose als etwas resistenter.

l-Arabit wird gar nicht, l-Arabinose nur ganz wenig von A-Organismen angegriffen.

Aus dem Mitgeteilten ist zu ersehen, daß immer da, wo ein Zucker gespalten wird, diese Spaltung unter Bildung von Säure stattfindet, und wo Säure entsteht, da ist auch immer *Acetaldehyd* nachzuweisen. Stets gelingt es, diese Verbindung selber mittels der Abfangmethode in größerer Menge zu fixieren!

Acetaldehyd steht deshalb inmitten des Gärungsvorganges auch für die Koli-Typhusbakterien; erblickt man mit *Neuberg* in dieser Verbindung das Zeichen für eine Beteiligung der Brenztraubensäure, so kann man sagen, daß diese Säure auch bei der gemischten Säuregärung der höheren Kohlenhydrate eine hervorragende Rolle zu erfüllen hat.

Außer auf die genannten Zuckerarten und Alkohole erstreckten sich unsere Untersuchungen auch auf einige andere Stoffe, welche teils als Gärungszwischenprodukte, teils als Gärungsendprodukte aufzufassen sind. Wir erinnern an die Triosenhypothese, welche Milchsäure, Glycerinaldehyd, Dioxyaceton, Methylglyoxal und Brenztraubensäure als Zwischenprodukte der alkoholischen Gärung berücksichtigt, und wir nennen zugleich die bekannten Endprodukte der gemischten Säuregärung Milchsäure, Bernsteinsäure, Essigsäure und Ameisensäure.

Es hat sich dabei herausgestellt, daß weder Methylglyoxal noch Bernsteinsäure, Essigsäure und Ameisensäure über Acetaldehyd durch die Bakterien der Koli-Typhusgruppe abgebaut werden. Sie werden scheinbar gar nicht angegriffen. Was die anderen Verbindungen anlangt, kann auf die nachfolgende Tabelle verwiesen werden:

Acetaldehydbildung von Koli-Typhusorganismen.

	Koli	Paratyphus B	Paratyphus A	Typhus	Dysent. *Sh. K.*
Glykol	+	±	±	±	±
Glykolsäure	+	—	—	—	—
Glycerin	+	±	±	±	±
Glycerinaldehyd	+	+	±	±	±
Glycerinsäure	+	+	+	+	±
Dioxyaceton	+	+	±	±	±
Methylglyoxal	—	—	—	—	—
Milchsäure	±	±	—	—	—
Brenztraubensäure . . .	+	+	+	+	+

Aus der Tabelle wird ersichtlich, daß die Brenztraubensäure die *einzige* Verbindung ist, bei der sich größere Mengen von Acetaldehyd während der bakteriellen Zersetzung nachweisen ließen und sich in dieser Hinsicht ganz und gar wie die Kohlenhydrate verhielt. Auch dadurch erhält die Lehre *Neubergs*, daß diese Säure eine hervorragende Bedeutung für die Gärungserscheinungen besitzt, eine, wie es uns vorkommt, kräftige Stütze.

Die Beziehung zwischen Brenztraubensäure und dem Kohlenhydratmolekül ist deshalb noch nicht eindeutig bestimmt, da Methylglyoxal gerade das einzige hypothetische Zwischenglied ist, das von Kolibakterien gar *nicht* angegriffen wird.

Neuberg[1]) hat gezeigt, wie man diese Schwierigkeit beseitigen kann; er schreibt: „Der Umstand, daß fertiges Methylglyoxal nicht vergärbar befunden worden ist, kann nicht ernstlich gegen die Formulierung geltend gemacht werden, denn es ist eine allgemeine biologische Gesetzmäßigkeit, daß es für physiologisches Geschehen einen großen Unterschied bedeutet, ob ein Stoff zugesetzt wird oder von Natur an richtiger Stelle und jeweils in geeigneter Menge entsteht. Das dürfte für einen Körper wie Methylglyoxal, das allein in mindestens acht verschiedenen monomolekularen und zahlreichen polymolekularen Formen existieren kann, ganz besonders zutreffen. Kaum eine andere Substanz kann überhaupt in so viel labilen Formen auftreten, wie gerade das Methylglyoxal!"

[1]) *C. Neuberg*, Die Gärungsvorgänge und der Zuckerumsatz der Zelle. Jena 1913.

Der Vollständigkeit wegen haben wir die verschiedenen Dysenteriebakterien einer umständlichen Untersuchung unterworfen. Es standen uns dabei, wie schon gesagt, zur Verfügung: *B. dysenteriae Shiga-Kruse, Flexner, Hiss, Y* und *Strong*. In der folgenden Tabelle sind die Resultate übersichtlich wiedergegeben. Dabei wurde nur auf die Entstehung von Säure geachtet, da wir schon angezeigt hatten, daß die Bildung von Säure immer mit der von Acetaldehyd verknüpft ist. Gas wird von diesen Organismen niemals gebildet.

Bacterium dysenteriae:

	Shiga-Kruse	*Flexner*	*Y*	*Strong*	*Hiss*
Glykol	—	—	—	—	—
Glycerin	—	—	—	—	—
Dioxyaceton	±	+	+	±	±
i-Erythrit	—	—	—	—	—
l-Arabit	—	—	—	—	—
i-Adonit	—	—	—	—	—
d-Mannit	—	+	+	+	+
d-Sorbit	—	—	—	—	—
i-Dulcit	—	—	—	—	—
l-Arabinose	+	+	+	+	+
l-Xylose	±	±	±	±	±
l-Rhamnose	—	—	—	—	—
d-Glucose	+	+	+	+	+
d-Mannose	+	+	+	+	+
d-Galaktose	+	+	+	+	+
d-Fructose	+	+	+	+	+
l-Gulose	—	—	—	—	—
l-Idose	—	—	—	—	—
Maltose	—	+	±	+	—
Saccharose	—	—	—	—	—
Lactose	—	—	—	—	—
Raffinose	—	—	—	—	—

Das Problem der Vergärung der Hexosen kann auf verschiedene Weise in Angriff genommen werden. Hierbei sind jedoch zwei Methoden scharf voneinander zu unterscheiden. Die eine Methode sucht durch direkte Analyse das Problem zu lösen, es ist dies die Methode, welche am meisten befolgt wird, aber, wie es uns vorkommt, nicht von großem Erfolg!

Die andere Methode ist eine indirekte und langweilige; es ist der Weg, welcher von uns gewählt ist.

Wir sind dabei von folgenden Erwägungen ausgegangen. Wenn man die Zerlegung einer 6-Kohlenstoffkette durch Bakterien studieren will, kann man am besten so verfahren, daß man sich das Problem einfacher stellt. Man kann sich im Anfang die Frage vorlegen, wie werden Verbindungen mit nur zwei Kohlenstoffatomen angegriffen, nachher kann man dann die 3-, 4-, 5- und endlich auch die 6-Kohlenstoffkette ins Bereich der Untersuchung ziehen.

Als Ausgangspunkt für unsere Untersuchungen haben wir den zweiwertigen Alkohol Glykol gewählt. Nachher haben wir Glycerin, Glycerinaldehyd, Glycerinsäure, Dioxyaceton und Brenztraubensäure in unsere Untersuchungen einbezogen.

Wir haben dabei mit der genauen Analyse der Gärungsprodukte angefangen.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß die Mikroorganismen der Koli-Typhusgruppe aus Pentose wie aus Hexose immer neben Kohlensäure und Wasserstoff ein Gemisch von organischen Säuren bilden. Diese Säuren sind Milchsäure, Bernsteinsäure, Essigsäure und Ameisensäure. Wie diese Stoffe entstehen, welche Umsetzungen das Zuckermolekül dabei erfährt, ist bis jetzt unklar und unsicher.

Wenn wir nicht, wie man gewohnt ist, mit der Untersuchung der Vergärung der Pentose und Hexose selbst anfangen, sondern mit viel einfacher gebauten Körpern, so war das nötig, da wir die Umsetzungen, welche diese einfachen Stoffe erfahren, aufs genaueste studierten.

Am übersichtlichsten ist es, die von uns dabei gefundenen Tatsachen in Tabellenform wiederzugeben. Es sei jedoch bemerkt, daß diese Resultate nur für *Bact. coli* und für *Bact. paratyphi B* erzielt sind. Die anderen Organismen werden noch in Angriff genommen, worüber gelegentlich berichtet werden soll.

Zersetzung durch Bact. coli und Bact. paratyphi B.

Glykol	Acetaldehyd	Essigsäure	—	—
Glycerin	Acetaldehyd Spuren Äthylalkohol	Essigsäure	CO_2 und H_2	Bernsteinsäure und sehr wenig Milchsäure
Glycerinaldehyd . .	Acetaldehyd Spuren Alkohol	Essigsäure	CO_2 und H_2	—
Glycerinsäure . . .	Acetaldehyd	Essigsäure	CO_2 und H_2	—
Dioxyaceton	Spuren Acetaldehyd „ Alkohol „ Acetylmethylcarbinol	Essigsäure	CO_2 und H_2	—
Brenztraubensäure .	„ „	Essigsäure	CO_2 und H_2	—

Immer wurde eine Blankoprobe Peptonwasser untersucht, wobei es niemals gelang, die Anwesenheit eines dieser Produkte nachzuweisen, wir können deshalb mit Sicherheit annehmen, daß die gefundenen Endprodukte aus dem zugesetzten Körper stammen. Von den erwähnten Stoffen wurden immer 5 g in 500 ccm Peptonwasser, d. h. zu einer Flüssigkeit von 1 Proz. in Lösung von Pepton „*Witte*“, gelöst, 10 Minuten auf 117° C erhitzt und dann filtriert. Nachher wurden 5 g Calciumcarbonat hinzugefügt und während zwei aufeinander folgenden Tagen bei 100° C sterilisiert. Der Inhalt wurde beimpft mit einer Öse einer 24stündigen Kultur des betreffenden Organismus und während 4 Wochen im Brutschrank bei 37° aufbewahrt. Von der Kulturflüssigkeit wurde dann eine chemische Analyse gemacht und die oben näher be-

zeichneten Stoffe gefunden. Die untersuchten Körper sind alle auf Reinheit geprüft, sie waren chemisch rein; nur der Glycerinaldehyd war ein wenig dioxyacetonhaltig.

Da Glycerinaldehyd und Dioxyaceton nicht ohne Zersetzung (Braunfärbung der Lösung) zu erhitzen sind, wurde hier die Sterilität erreicht mittels der Kerzenfiltration und das Calciumcarbonat steril zugesetzt. Immer haben wir uns überzeugt, daß alle Kulturmedien beim Gebrauch absolut keimfrei waren.

Glycerinsäure und Brenztraubensäure wurden als Natriumsalze untersucht, da die freien Säuren die Entwicklung der Mikroorganismen hemmen. Das brenztraubensaure Natriumsalz muß ebenfalls durch Filtration sterilisiert werden.

Wie aus dem Mitgeteilten zu ersehen ist, erzeugen die untersuchten Mikroben immer Essigsäure und daneben auch zugleich Acetaldehyd. Da wir hier nicht das Abfangverfahren angewendet haben, so ist bei gewissen Stoffen nur eine Spur, bei Brenztraubensäure selbst gar kein Acetaldehyd gefunden. Mit Ausnahme von Glykol entstehen auch immer Kohlensäure und Wasserstoff.

Die Schnelligkeit, womit die Stoffe zersetzt wurden, war nicht immer die gleiche. Während Glycerin, Glycerinaldehyd und Brenztraubensäure sehr schnell und kräftig wie die Kohlenhydrate vergoren wurden, war die Vergärungsgeschwindigkeit von Dioxyaceton und von Glycerinsäure langsamer. Wenn man dabei an die Zuckervergärung denkt, so wird man geneigt, die zuletzt genannten Verbindungen als Zwischenprodukte gänzlich abzulehnen.

Es ist nicht zu leugnen, daß das Zersetzungsschema dieser ziemlich einfachen Stoffe das gleiche Bild zeigt und daß es deshalb wahrscheinlich ist, daß dabei derselbe oder doch der gleiche Weg befolgt wird.

Bemerkenswert ist es, daß hier nirgends Ameisensäure als Zersetzungsprodukt auftritt und daß der einzige Stoff, der dasselbe Vergärungsbild wie die Zuckerarten zeigt, Glycerin ist. Hier finden wir fast dasselbe komplizierte Gemisch von Endprodukten, nur fehlt, wie gesagt, die Ameisensäure, und außerdem tritt die Milchsäure noch nicht in den Vordergrund.

Es stellte sich heraus, daß das *Bact. coli* die Verbindungen am kräftigsten angreift, jedoch bilden der Koliorganismus und der Paratyphusbazillus B dieselben Vergärungsprodukte; diese Mikroben unterscheiden sich voneinander in dieser Hinsicht bloß quantitativ. Um dem Problem näher zu kommen, war es wünschenswert, die Sache auch quantitativ ins Auge zu fassen, um auf Grund der so erhaltenen Resultate sich eine Vorstellung von dem obwaltenden Chemismus zu machen. Eine große Schwierigkeit bei der Lösung dieses Problems ist jedoch, daß die Chemie bis jetzt uns nicht die Mittel an die Hand

gibt, ein so kompliziertes Gemisch von organischen Stoffen quantitativ zu trennen. Doch ist es uns gelungen, für Glykol und Brenztraubensäure und gewissermaßen auch für Glycerin den Weg zu finden. Da das *Bacterium coli* am kräftigsten vergärt, wird von uns nur dieser Organismus gewählt, da es für eine genaue Analyse wünschenswert erschien, die so sehr verschiedenen Umwandlungsprodukte in nicht zu geringer Menge zur Verfügung zu haben.

Die zu untersuchenden Verbindungen wurden immer in Peptonwasser (1 proz.) gelöst; für die Neutralisation der entstandenen Säuren wurde immer Calciumcarbonat hinzugefügt. Nach geeigneter Sterilisation wurde das Ganze mit einer Öse einer 24stündigen Agarkultur beimpft und bei 37° für 30 Tage hingestellt.

Auf die Ausführung der Analysen werden wir im experimentellen Teile, wo die Methodik skizziert wird, zurückkommen, hier werden wir uns auf die Mitteilung der erhaltenen Tatsachen beschränken.

Die Vergärung von Glykol.

Aus 229 mg Glykol (als Kohlenstoff berechnet 88,6 mg) wurden erhalten 89 mg Acetaldehyd (48,5 mg Kohlenstoff) und 87 mg Essigsäure (34,8 mg Kohlenstoff). Von dem ursprünglich anwesenden Kohlenstoff wurden deshalb 83,3 mg oder 94 Proz. zurückgefunden. Eine zweite Analyse, wobei 222 mg Glykol (86 mg Kohlenstoff) umgesetzt waren, lieferte uns 45,2 mg Acetaldehyd (83 mg Kohlenstoff) und 89 mg Essigsäure (35,6 mg Kohlenstoff). Von 86 mg Kohlenstoff wurden deshalb 80,8 mg oder 93,9 Proz. als Umsetzungsprodukte wiedergefunden. In beiden Fällen waren 485 mg Glykol der Peptonlösung zugefügt. Hieraus wird ersichtlich, daß 256 mg bzw. 263 mg Glykol vom Koliorganismus unangegriffen zurückgelassen wurden. Eine Erklärung dieser Erscheinung ist zu suchen in der Tatsache, daß freier Acetaldehyd schon in einer Konzentration von 0,2 Proz. hemmend auf die Entwicklung von *Bact. coli* einwirkt.

Das Defizit von 6 Proz. an Kohlenstoff bei der Kohlenstoffbilanz ist zum Teil auf die neu entstandene Bakterienleibersubstanz zu schreiben, für den anderen Teil auf Ungenauigkeiten, welche bei der Analyse unvermeidlich sind.

Wie hat man sich die Entstehung von Acetaldehyd und von Essigsäure zu denken? Es lag auf der Hand, anzunehmen, daß das Glykol sich in Acetaldehyd verwandelt und daß dieser Umsetzung eine zweite folgt, wobei durch Oxydation Essigsäure entsteht.

Da bei der Zersetzung keine gasförmigen Körper entstehen, auch kein Wasserstoff, war daran zu denken, daß die ganze Umsetzung in aerober Weise vonstatten geht, und daß die Oxydation mit großer Wahrscheinlichkeit vom Luftsauerstoff bewirkt wird. Es war deshalb

wünschenswert, den ganzen Prozeß unter streng anaeroben Verhältnissen auszuführen, damit wir imstande waren, den Einfluß des freien Sauerstoffs ganz auszuschalten. Hierbei zeigte es sich, daß jetzt von einer Entstehung von Essigsäure gar keine Rede mehr war.

Die aerobe Zersetzung von Glykol durch das *Bacterium coli* besteht deshalb aus zwei nachfolgenden Umsetzungen, nämlich in der Verwandlung durch intramolekulare Atomverschiebung des Glykols in Acetaldehyd und die darauf stattfindende Oxydation des primären Umwandlungsproduktes in Essigsäure. Wir können dann auch schreiben:

$$\underset{\text{Glykol}}{C_2H_6O_2} \rightarrow \underset{\text{Acetaldehyd}}{C_2H_4O} + H_2O$$

und

$$\underset{\text{Acetaldehyd}}{C_2H_4O + O} \rightarrow \underset{\text{Essigsäure}}{C_2H_4O_2}$$

Die Vergärung der Brenztraubensäure.

Während der Vergärung von Brenztraubensäure, welche vorher genau mittels Lauge neutralisiert war, hatten sich in 30 Tagen bei 37° C aus 537 mg bzw. aus 496 mg (219,7 und 202,9 mg Kohlenstoff) 351,2 und 321 mg Essigsäure (140,5 und 120,4 mg Kohlenstoff) und 267 bzw. 246,2 mg Kohlendioxyd (72,8 und 67,2 mg Kohlenstoff) gebildet. Von dem ursprünglich als Brenztraubensäure anwesenden Kohlenstoff waren deshalb 97,1 und 96,4 Proz. in Essigsäure und Kohlensäure verwandelt. Das geringe Defizit an Kohlenstoff ist auf gleiche Weise zu erklären wie beim Glykol.

Man kann die ganze Umsetzung jetzt in einer Gleichung ausdrücken, wenn man nur erwägt, daß auch gasförmiger Wasserstoff dabei entsteht:

$$\underset{\text{Brenztrauben-säure}}{C_3H_4O_3} + H_2O \rightarrow \underset{\text{Essigsäure}}{C_3H_4O_2} + CO_2 + H_2$$

Wir haben schon mitgeteilt, daß es mittels des Abfangverfahrens möglich ist, als Zwischenprodukt dieser Reaktion Acetaldehyd nachzuweisen. Aber während die Oxydation bei der Zerlegung von Glykol einen nur nebensächlichen Charakter zeigt und von dem Luftsauerstoff bewirkt wird, ist hier die Entstehung der Essigsäure aufs innigste mit der ganzen Zersetzung verbunden, sie verläuft denn auch ganz ebenso unter den strengsten anaeroben Umständen.

Wenn wir jetzt alle die schon mitgeteilten Resultate der Vergärung betrachten, so können wir ersehen, daß, ausgenommen von Spuren von Nebenprodukten (wie Acetaldehyd, Äthylalkohol und Acetylmethylcarbinol), bei der Zersetzung auch von Glycerinaldehyd und Dioxyaceton immer dieselben Hauptprodukte auftreten, nämlich: Kohlendioxyd, Wasserstoff und Essigsäure, ganz so wie bei der Ver-

gärung der Brenztraubensäure. Die Entstehung der Essigsäure bringt hier den Hinweis, daß bei den Zerlegungen von Glycerinaldehyd und Dioxyaceton ebenfalls die Brenztraubensäure mit großer Wahrscheinlichkeit die intermediäre Rolle erfüllt, daß auch diese Gärungen im Wesen Brenztraubensäuregärungen sind. Auch hier tritt deutlich zutage die nahe Verwandtschaft zwischen den für das Gärungsproblem so vielfach genannten drei Kohlenstoffkörpern Glycerinaldehyd, Dioxyaceton und Methylglyoxal. Es scheint, als ob eine labile Form existiert, die aus diesen Verbindungen gemeinsam hervorgeht und gärungsfähig ist.

Die Entwicklung des Wasserstoffs ist wieder ein Zeichen dafür, daß auch hier eine Oxydation mittels des Sauerstoffs des Wassermoleküls, eine Hydroxydation erfolgt, wie wir diese Erscheinung nennen möchten. Einen Beweis dafür erblicken wir in der Tatsache, daß genau dieselbe Zergliederung, aber weniger intensiv, unter streng anaeroben Bedingungen auftritt. Ein Einfluß seitens des Luftsauerstoffs ist deshalb ganz abzulehnen.

Auf Grund der errungenen Tatsachen und Überlegungen haben wir uns das folgende Schema aufgestellt von den Vorgängen während dieser Vergärungen.

Die Vergärung der *Brenztraubensäure:*

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CO \\ | \\ COOH \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CHO \end{array} + CO_2 \quad \text{(Carboxylasewirkung)}$$

Acetaldehyd

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CHO \end{array} + H_2O \rightarrow \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ COOH \end{array} + H_2 \quad \text{(Hydroxydation).}$$

Essigsäure

Die Vergärung von *Glycerinaldehyd:*

$$\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CHO \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} CH_2 \diagdown \\ | \quad\;\; O \\ CH \diagup \\ | \\ CHO \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CO \\ | \\ CHO \end{array}$$

Hypothetisches Zwischenprodukt — Methylglyoxal

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CO \\ | \\ CHO \end{array} + H_2O \rightarrow \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CO \\ | \\ COOH \end{array} + H_2$$

Brenztraubensäure

Die Annahme des Entstehens eines methylenoxydartigen Zwischenprodukts bei der Zersetzung des Glycerinaldehyds stützt sich auf die Umwandlung von Glykol in Acetaldehyd, wovon wir schon gesprochen haben. Wir stellen uns nämlich diese Umwandlung auf die Weise vor.

daß aus dem Glykolmolekül, CH_2OH-CH_2OH, ein Zwischenprodukt durch Anhydrisierung entsteht, d. h. Methylenoxyd $\overset{O}{CH_2-CH_2}$, eine Verbindung, die dann durch eine intramolekulare Atomverschiebung von der Art einer Pinakolinumlagerung in Acetaldehyd übergeht:

$$\overset{O}{CH_2-CH_2} \rightarrow CH_3-CHO.$$

Ganz derselbe Gedanke ist zur Erklärung der Glycerinaldehydvergärung seitens des Koliorganismus mit gutem Erfolg anzuwenden. Was jetzt die Zerlegung von *Dioxyaceton* anbelangt, welche wieder dieselben Endprodukte liefert, so bemerken wir, daß die Umsetzung langsamer vonstatten geht, die Entstehung der vergärbaren Konfiguration ist allem Anschein nach mit großen Schwierigkeiten verknüpft.

Wenn wir uns auf unsere Betrachtungen betreffs der Vergärung von Glykol und Glycerinaldehyd stützen, dann ist auch hier der ganze Chemismus als eine Deshydratation, eine intramolekulare Atomverschiebung und eine Hydroxydation zu deuten und das Problem auf die Vergärung von Benztraubensäure zurückzuführen.

Wir haben uns deshalb die Umwandlungen wie folgt gedacht:

$$\begin{array}{ccccc} CH_2OH & \rightarrow & CH_2 \diagdown & \rightarrow & CH_3 \\ | & & | & & | \\ CO & & CO \quad O & & CO \\ | & & | & & | \\ CH_2OH & & CH_2 \diagup & & CHO \\ \text{Dioxyaceton} & & & & \text{Methylglyoxal} \end{array}$$

$$\begin{array}{ccc} CH_3 + H_2O & \rightarrow & CH_3 \quad + H_2 \\ | & & | \\ CO & & CO \\ | & & | \\ CHO & & COOH \end{array}$$

Bei dieser Vorstellung hat man zu bedenken, daß es sich hier auch um hydratierte Verbindungen handeln kann, daß das vielleicht gerade diese Verbindungen sind, welche für das Zustandekommen dieser Umsetzungen von großer Wichtigkeit sind. So z. B. kann man sich die Reaktion Dioxyaceton—Methylglyoxal auch folgenderweise deuten:

$$\begin{array}{ccccc} CH_2OH & \rightarrow & CH_3 & \text{oder} & CH_3 \\ | & & | & & | \\ CO & & C{<}^{OH}_{OH} & & CO \\ | & & | & & | \\ CH_2OH & & CHO & & CH{<}^{OH}_{OH} \end{array}$$

Es will uns jedoch scheinen, daß diese Vorstellung, die als eine sehr energische intramolekulare Atomverschiebung anzunehmen und nicht so einfach und übersichtlich ist, als die von uns entwickelte; doch ist zu bemerken, daß die Form des Methylglyoxals, die wir kennen,

nicht von Bacterium coli angegriffen wird, was vielleicht auf eine besondere Struktur dieser Verbindung hinweist.

Während der Vergärung von *Glykol* und *Glycerinsäure* entsteht vielmehr Acetaldehyd. Während dieser Stoff bei Glykol Endprodukt ist, ist dieses bei Glycerinsäure jedoch nicht der Fall, denn auch hier entweicht gasförmiger Wasserstoff. Im letzteren Falle ist denn auch eine Hydroxydation der entstandenen Acetaldehyds anzunehmen.

Wir stellen uns vor, daß die Umwandlung von Glycerinsäure über Glycidsäure zustande kommt.

$$\begin{array}{lcl} CH_2OH & \rightarrow & CH_2 \diagdown & \rightarrow & CH_3 \\ | & & | \quad\; O & & | \\ CHOH & & CH \diagup & & CO \\ | & & | & & | \\ COOH & & COOH & & COOH \end{array}$$

Im Vergleich damit haben wir auch die *Glykolsäure* unseren Beobachtungen unterworfen; es stellte sich heraus, daß die genannte Säure gar nicht vergoren wird. Glycerinsäure vergärt schwer, denn die Reaktion verläuft äußerst träge. In der Glycerinreihe hat es den Anschein, daß mit der weiteren Oxydation des endständigen Kohlenstoffatoms die Vergärbarkeit abnimmt.

Damit sind wir bei der Vergärung von *Glycerin* angelangt und zugleich bei der Vergärung der Zuckerarten, denn, wie wir schon mitteilten, treten uns hier dieselben Endprodukte entgegen, welche gerade für die Zuckerzersetzung charakteristisch sind. Hier finden wir fast das gleiche bunte Gemisch von Stoffen, das neben Kohlensäure, Wasserstoff und Essigsäure auch Milchsäure und Bernsteinsäure enthält, nur fehlt die Ameisensäure ganz!

Diese merkwürdige Gleichheit der Vergärung war ganz unerwartet, da wir gehofft hatten, nur allmählich vom Einfachen bis zum Komplizierten, d. h. bis zur Vergärung der Kohlenhydrate, hinaufzusteigen und wir uns hier mit einem Male vor das ganze Problem gestellt sahen. Nur das ist dabei merkwürdig, daß nur ganz wenig Milchsäure entsteht und gar keine Ameisensäure.

Wir haben versucht, eine quantitative Analyse der Glycerinvergärung auszuführen. Die Methodik der analytischen Chemie ist noch sehr mangelhaft, so daß es uns nicht gelungen ist, eine ganz befriedigende Kohlenstoffbilanz aufzustellen.

Aus 487 mg auskristallisierten Glycerins entstanden 43,2 mg Acetaldehyd, 98 mg Essigsäure, 28,5 mg Bernsteinsäure, 13,8 mg Milchsäure und 163,2 mg Kohlendioxyd, d. h. von 190,5 mg vergorenen Kohlenstoffs sind anwesend 23,6 mg als Acetaldehyd, 39,2 mg als Essigsäure, 11,6 mg als Bernsteinsäure, 5,5 mg als Milchsäure und 44,5 mg als Kohlendioxyd, in toto 124,4 mg Kohlenstoff.

Das Defizit beträgt hier 66,1 mg. Hierbei ist jedoch zu bedenken, daß, wie uns das Experiment lehrt, 76 mg Bakterienmaterial geschaffen sind. *Kruse* hat betont, daß fast 50 Proz. dieser Materie aus Kohlenstoff besteht, im vorliegenden Falle deshalb 38 mg Kohlenstoff. Das Defizit wird durch diese mächtige Bakterienentwicklung stark reduziert und bis auf 28,1 mg herabgedrückt, d. h. auf 14,7 Proz. Doch ist zu bemerken, daß vielleicht nicht aller Kohlenstoff der Bakterien vom Glycerin stammt, zum Teil vielleicht auch dem Pepton entnommen ist; jedoch ist dabei gleichfalls zu bedenken, daß die Vergärung sehr energisch verläuft, da in 30 Tagen von 900 mg Glycerin 500 mg vergoren wurden. Auf Grund der mitgeteilten Tatsachen kann man sagen, daß die Vergärung von Glycerin der Hauptsache nach wieder eine Essigsäurevergärung ist, wie wir sie auch von Glycerinaldehyd, Glycerinsäure, Dioxyaceton und Brenztraubensäure kennen. Auch hier ist die Entstehung der Essigsäure an eine Hydroxydation gebunden und deshalb von einer Wasserstoffentwicklung begleitet, da auch hier der ganze Prozeß unter anaeroben Umständen auf die gleiche Weise vonstatten geht.

Wir können deshalb die Glycerinzersetzung uns wie folgt denken:

$$\begin{array}{lllll} CH_2OH & \rightarrow & CH_2\diagdown & \rightarrow & CH_3 \\ | & & |\quad\;\; >O & & | \\ CHOH & & CH\diagup & & CO \\ | & & | & & | \\ CH_2OH & & CH_2OH & & CH_2OH \\ & & & & \text{Brenztraubenalkohol} \end{array}$$

$$\begin{array}{lllll} CH_3 & + H_2O & \rightarrow & CH_3 & + 2\,H_2 \\ | & & & | & \\ CO & & & CO & \\ | & & & | & \\ CH_2OH & & & COOH & \\ & & & \text{Brenztraubensäure} & \end{array}$$

Neben dieser Reaktion laufen noch andere Umsetzungen ab; denn außer Kohlendioxyd, Wasserstoff, Acetaldehyd und Essigsäure entstehen auch Bernsteinsäure und Milchsäure, wenn auch in kleiner Menge.

Die Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure ist bekannt, welche schon beim Erhitzen mit Wasser auf 100^0 langsam erfolgt, es ist deshalb möglich, daß diese Reaktion sich auch hier vollzieht. Auch die gleiche Umsetzung von Dioxyaceton durch Destillation mit verdünnter Schwefelsäure ist möglich, und auch daran ist zu denken, denn, wenn wir uns darauf stützen, so können wir für die Entstehung von Milchsäure das gleiche Schema benutzen, das wir schon bei der Dioxyacetonvergärung entwickelt haben, nämlich:

$$\begin{array}{lllll} CH_2OH & \rightarrow & CH_2\diagdown & \rightarrow & CH_3 \\ | & & & & | \\ CHOH & & CHOH>O & & CHOH \\ | & & | & & | \\ CH_2OH & & CH_2\diagup & & CHO \\ \text{Glycerin} & & & & \text{Milchsäurealdehyd} \end{array}$$

Ganz analog:

$$\begin{array}{ccccc} CH_2OH & \rightarrow & CH_2 & & \rightarrow & CH_3 \\ | & & | & \diagdown & & | \\ CO & & CO & \;\;O & & CO \\ | & & | & \diagup & & | \\ CH_2OH & & CH_2 & & & CHO \end{array}$$

Dioxyaceton Brenztraubenaldehyd

Wir haben die letzte Vorstellungsweise gewählt und nicht die Umwandlung Methylglyoxal in Milchsäure, da es uns nicht möglich war, diese Säure als Gärungsprodukt bei der Zersetzung von Glycerinaldehyd nachzuweisen, und doch war hier die Anwesenheit der Milchsäure zu erwarten gewesen.

$$\begin{array}{ccccc} CH_2OH & \rightarrow & CH_2 & & \rightarrow & CH_3 \\ | & & | & \!\!>O & & | \\ CHOH & & CH & & & CO \\ | & & | & & & | \\ CHO & & CHO & & & CHO \end{array}$$

Glycerinaldehyd Methylglyoxal

Auch bei der Dioxyacetonvergärung wird Milchsäure nicht gefunden, so daß die Umsetzung von Methylglyoxal in Milchsäure hier nicht stattfindet.

Die oben gegebene Vorstellung, welche wir als Dioxyacetonumlagerung im Gegensatz zur Glykolumlagerung deuten, macht die Entstehung von Milchsäurealdehyd als Zwischenprodukt wahrscheinlich, woraus durch eine Hydroxydation die Milchsäure entsteht.

$$\begin{array}{ccccc} CH_3 & + H_2O & \rightarrow & CH_3 & + H_2 \\ | & & & | & \\ CHOH & & & CHOH & \\ | & & & | & \\ CHO & & & COOH & \end{array}$$

Was die Entstehung der Bernsteinsäure anlangt, so hat man, wie bei der Entstehung von Methylacetylcarbinol, das in Spuren bei der Vergärung von Brenztraubensäure und Dioxyaceton mittels der Reaktion von *Voges* und *Proskauer* nachgewiesen werden kann, an synthetische Vorgänge zu denken, wie sie von *C. Neuberg* und seinen Mitarbeitern[1]) entdeckt worden sind. Die Bildung von Methylacetylcarbinol ist als eine einfache Acetoinbildung aufzufassen,

$$CH_3-CHO+HOC-CH_3 = CH_3-CHOH-CO-CH_3.$$

Wie haben wir uns jedoch die Bernsteinsäure entstanden zu denken?

[1]) *Neuberg* und *Hirsch*, diese Zeitschr. **115**, 282, 1921; *Neuberg* und *Liebermann*, ebendaselbst **121**, 311, 1921; *Neuberg* und *Reinfurth*, ebendaselbst **143**, 553, 1923.

Wir denken uns diese Säure ebenfalls aus zwei Molekülen Acetaldehyd geformt, welche aus Brenztraubensäure in statu nascendi sehr reaktionsfähig hervorgeht.

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CO \\ | \\ COOH \end{array} \text{ oder } \begin{array}{l} CH_2 \\ | \\ CH \\ | \\ COOH \end{array}\!\!\!>O \;\rightarrow\; \begin{array}{l} CH_2 \\ | \\ CH \\ | \end{array}\!\!\!>O + CO_2 + H$$

Brenztraubensäure

$$\begin{array}{l} CH_2 \\ | \\ CH \\ | \end{array}\!\!\!>O + \begin{array}{l} CH_2 \\ | \\ CH \end{array}\!\!\!>O \;\rightarrow\; \begin{array}{l} CH_2 \\ | \quad >O \\ CH \\ | \\ CH \\ | \quad >O \\ CH_2 \end{array} \;\rightarrow\; \begin{array}{l} CHO \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CHO \end{array}$$

Bernsteinsäurealdehyd

Der Bernsteinsäurealdehyd geht durch eine Hydroxydation in Bernsteinsäure über.

$$\begin{array}{l} CHO \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CHO \end{array} + 2H_2O \;\rightarrow\; \begin{array}{l} COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + 2H_2$$

Bernsteinsäure

Nur eine Frage bleibt bei dieser Vorstellung unbeantwortet, nämlich diese: Warum bei der bakteriellen Glycerinsäurevergärung keine, bei der Glycerinvergärung wohl Bernsteinsäure entsteht. Vorläufig können wir darauf keine Antwort geben, nur so viel wissen wir, daß die Glycerinvergärung etwas ganz anderes ist. Wir hoffen darauf zu gelegener Zeit nochmals zurückzukommen, denn wir sind überzeugt, daß hier der Schlüssel für das Problem der bakteriellen Zuckervergärung zu suchen ist.

Experimentelles.

Kurzgefaßte Beschreibung der Methodik.

Wie bereits erwähnt, dienten uns als Erreger bei diesen Untersuchungen die Bakterien der Koli-Typhusgruppe, und zwar bei den qualitativen Untersuchungen, da nur das *Bact. coli* für die quantitativen Proben herangezogen ist. Denn von diesen Bakterien vergärt das *Bact. coli* am kräftigsten, erzeugt deshalb auch die größten Mengen von Gärungsprodukten. Alle Bakterien wurden auf ihre morphologischen und kulturellen Eigenschaften untersucht und mehrfach auf ihre Reinheit geprüft.

Vergebens haben wir versucht, ein anorganisches Milieu herzustellen, zu dem wir die zu untersuchenden Stoffe hätten zufügen können, aber es hat sich dabei herausgestellt, daß zwar die Koliorganismen und die Para-

typhusbakterien sich darin entwickeln, wie einer[1]) von uns schon vor längerer Zeit nachgewiesen hat, daß jedoch die mehr parasitären Arten versagten. Auch hatte die Gärungsintensität der sich entwickelnden Organismen stark gelitten, so daß die Analyse der Gärungsprodukte dadurch sehr erschwert wurde. Deshalb haben wir eine 1 proz. Peptonlösung als Medium gewählt.

Für die Untersuchung auf Vergärbarkeit der verschiedenen Zuckeralkohole und Zuckerarten haben wir uns immer einer ½ proz. Lösung im Peptonwasser bedient.

Um einer Zersetzung der Kohlenhydrate ganz vorzubeugen, wurde eine zweimalige Sterilisation auf 100° während einer halben Stunde gewählt.

Immer wurde die Sterilität des Nährsubstrats festgestellt und erst dann das Experiment begonnen.

Für das Abfangverfahren haben wir wieder die 1 proz. Peptonlösung gewählt, zu der wir 2 Proz. sekundäres schwefligsaures Natrium, 1 Proz. Calciumcarbonat und 2 Proz. des zu untersuchenden Stoffes fügten. Wenn die Art des Stoffes eine Erhitzung nicht zuließ, wurde die Kerzenfiltration für die Sterilisation zur Anwendung gebracht.

In der Regel haben wir die Lösungen mit einer Öse einer 24 stündigen Agarkultur beimpft. Die Kulturen stellten wir während 5 bis 12 Tage im Brutschrank bei 37° auf; sie wurden auf die Anwesenheit von Gas, Säure und Acetaldehyd untersucht.

Der Acetaldehyd ist von uns immer im Destillat mittels der Reaktion von *Rimini*[2]) und mittels des Paranitrophenylhydrazons nachgewiesen.

Auch hier haben wir uns durch Blankoproben überzeugt, daß die geformten Produkte nicht dem Pepton, sondern nur den zugesetzten Stoffen entstammten.

Für eine genaue Analyse der Gärungsprodukte war es wünschenswert, die Vergärung während 30 Tage bei 37° in Gang zu halten. Als Milieu bedienten wir uns wieder der schon mehrfach erwähnten Peptonlösung mit 1 Proz. Calciumcarbonat und 1 Proz. der zu vergärenden Substanz.

Untersucht wurde die Kulturflüssigkeit auf Acetaldehyd, Äthylalkohol, Acetylmethylcarbinol, Ameisensäure, Essigsäure, Bernsteinsäure und Milchsäure.

Acetaldehyd und Äthylalkohol wurden im Destillat nachgewiesen, und zwar die erste Verbindung auf die schon angedeutete Weise; Äthylalkohol mittels der Jodoformreaktion, als Äthylbenzoat und mit der Reaktion von *Blanksma*[3]).

Nach Abdestillieren dieser beiden Verbindungen wurde der Destillationsrückstand mittels verdünnter Schwefelsäure sauer gemacht und aus ihren Calciumsalzen frei gemachte Säuren, der Destillation unterworfen.

Im Destillat wurde auf Ameisensäure mit der Reaktion von *Sérullas*[4]) und mit der von *Hehner*[5]) geprüft; die Essigsäure mittels der Kakodylreaktion und nach Trockendestillation des Calciumsalzes als Aceton mit der Reaktion von *Frommer* und *Emilewicz*[6]) nachgewiesen.

[1]) *W. C. de Graaff*, Tydschr. v. vergel. Geneerk. 1917, 1918 und 1919.
[2]) *Rimini*, Chem. Centralbl. **1898**, II, 277.
[3]) *J. J. Blanksma*, Chem. Weekbl. 1914, S. 206.
[4]) *Sérullas*, Chem. Centralbl. **1831**, S. 868.
[5]) *Hehner*, The Analyse 1896, S. 94.
[6]) *Frommer* und *Emilewicz*, Berlin. klin. Wochenschr. 1905, S. 1008.

Der Destillationsrückstand wurde nach dem Eindampfen auf das halbe Volumen mit Äther ausgezogen und im Ätherextrakt nach Bernsteinsäure mikrochemisch (Bleisuccinat) gesucht. Für die Trennung von Bernsteinsäure und Milchsäure wurden die Säuren mittels Barytlösung genau neutralisiert; das Bariumsuccinat mit verdünntem Alkohol präzipitiert und von dem auch im verdünnten Spiritus löslichen Bariumlactat abfiltriert. Im Filtrat wurde nach Vertreiben des Alkohols nach Milchsäure gesucht; mikrochemisch in Form von Kobaltlactat, makrochemisch nach Oxydation mit alkalischer Kaliumpermanganatlösung mit Brenztraubensäure (Nitroprussidreaktion). Methylacetylcarbinol war lediglich mittels der Farbreaktion von *Voges* und *Proskauer* nachzuweisen.

Die quantitative chemische Analyse der Vergärungsprodukte war viel schwerer in ihrer Ausführung. Sie hatte zu umfassen die Bestimmung der Gase (Kohlendioxyd und Wasserstoff), der flüchtigen Verbindungen (Acetaldehyd, Ameisensäure und Essigsäure) und der nicht flüchtigen Verbindungen (Bernsteinsäure und Milchsäure). Außerdem war es nötig, die vergärenden Substanzen selbst quantitativ zu analysieren, was für Glykol, Glycerin und Brenztraubensäure ausgeführt ist.

Die Gase wurden quantitativ in ein Eudiometerrohr gebracht. Das Kohlendioxyd mittels Kaliumhydroxyd absorbiert und das Volumen festgestellt. Nach Absorption der Kohlensäure wurde der Rest mit einem bestimmten Übermaß Sauerstoff gemischt, entzündet und die eintretende Volumenverringerung gemessen.

Es stellte sich bei unseren Versuchen heraus, daß das Gasgemisch nur aus Wasserstoff und Kohlendioxyd besteht, Methan wurde niemals nachgewiesen.

Das Volumen der erzeugten Gase war bei einer und derselben Vergärung nicht konstant; das eine Mal waren es z. B. 20 ccm, das andere Mal nur 12 ccm. Auch das Verhältnis der Gase war nach derselben Zeit, z. B. 24 Stunden, wechselnd. Wohl kann man sagen, daß nach ungefähr 1 Woche das Gesamtvolumen das größte ist, nachher tritt eine Verringerung ein, da das Kohlendioxyd vom entstandenen, aus dem Pepton der Nährlösung herstammenden Ammoniak allmählich absorbiert wird.

Bei der Vergärung unter Zusatz von Kreide war ein anderer Weg für die Bestimmung des Kohlendioxyds zu betreten, da hier auch aus der Kreide durch die Einwirkung der entstandenen Säuren Kohlensäure entsteht, welche für uns von keinem Werte war, da wir nur mit dem aus dem zugesetzten Stoffe entstandenen Kohlendioxyd zu rechnen haben.

Die von der Gärung herstammenden Gase wurden von zwei Natronkalkröhrchen von Kohlensäure befreit. Die Gewichtszunahme dieser Röhrchen gibt das Quantum der entstandenen und von Natronkalk absorbierten Kohlensäure an.

Um aus dieser Gesamtmenge von Kohlendioxyd die von den Säuren aus der Kreide hergestellte Kohlensäure abziehen zu können, haben wir diese Menge mittels einer Calciumbestimmung der Lösung vor und nach der Vergärung bestimmt. Die Differenz beider gibt ein Maß für die von den Säuren aus der Kreide frei gemachten Kohlensäure.

Für die quantitative Bestimmung des *Acetaldehyds* haben wir die Methode von *Ripper*[1]) gewählt, nur sei man dabei bedacht, um einem

[1]) *Ripper*, Monatshefte d. Chem. 1900, S. 1079.

Verlust von Schwefeldioxyd vorzubeugen, das Gemisch von Bisulfit und Aldehyd unter die titrierte Jodlösung fließen zu lassen und dann vorsichtig und leise zu mischen.

Die *Essigsäure* wurde nach Dampfdestillation durch Titration mit Lauge bestimmt. *Ameisensäure* war niemals zu berücksichtigen.

Milchsäure wurde nur nach Vergärung von Glycerin nachgewiesen, und zwar in kleiner Menge. Hier haben wir die äußerst geringe Flüchtigkeit dieser Säure mit Wasserdampf vernachlässigt und sie als Essigsäure berechnet.

Die *Bernsteinsäure* wurde mittels Äther durch mehrtägige Extraktion der Lösung entzogen, die vorher mit verdünnter Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion versetzt war.

Der Ätherrückstand wurde nach Abdampfung auf dem Wasserbade in Alkohol von 96 Proz. gelöst und noch heiß mit kochender, gesättigter Barytlösung gegen Phenolphthalein genau neutralisiert, aufgekocht und unter Abschluß eines Natronkalkröhrchens ganz gekühlt.

Der Niederschlag von Bariumsuccinat wurde gesammelt, gewaschen und gewogen.

Milchsäure wurde durch Bestimmung des Gesamtsäuregrades und Abzug der gefundenen Menge Essigsäure und Bernsteinsäure gefunden.

Zum Schluß werden noch die Methoden besprochen für die Bestimmung der unzersetzten Mengen Glykols, Glycerins und Brenztraubensäure.

Die *Glycerin*bestimmung konnte bei unseren Untersuchungen folgendermaßen ausgeführt werden. 50 ccm der Glycerinpeptonlösung wurden bis auf etwa 3 ccm eingedampft, einige Tropfen Alkohol (96proz.) zugefügt und mittels Aceton das Glycerin ausgezogen. Nach 24 Stunden wurde die Acetonlösung gesammelt, abgedampft und der glycerinhaltige Rückstand 2 Tage über Schwefelsäure getrocknet und gewogen. Die *Glykol*bestimmung ist auf gleiche Weise ausgeführt. Das extrahierte Glykol bedarf jedoch einer energischen Trocknung, denn erst nach 5 Tagen wird Gewichtskonstanz im Schwefelsäureexsikkator erreicht.

Die *Brenztraubensäure*bestimmung kann durch Umwandlung dieser Säure in ihr Hydrazon bequem ausgeführt werden.

Untersuchungen über den Einfluß ultravioletter Strahlen auf die akzessorischen Nährstoffaktoren.

Bemerkung zu der Mitteilung von *Joseph Špinka.*

Von

S. S. Zilva.

(Aus dem Biochemical Department, Lister Institute, London.)

(Eingegangen am 3. Januar 1925.)

In einer Reihe von Mitteilungen hat *Špinka*[1]) in dieser Zeitschrift eine Anzahl von Versuchen über die Wirkung des ultravioletten Lichtes in Gegenwart und Abwesenheit von Luft auf die Vitamine beschrieben. Zu meiner Befriedigung kann ich feststellen, daß er im allgemeinen die Ergebnisse bestätigt, die ich einige Jahre früher[2]) bei ähnlichen Untersuchungen erzielt habe. Auf eine Bemerkung *Špinkas* muß ich jedoch zwecks Vermeidung von Mißverständnissen eingehen. In seinen Experimenten mit Vitamin A fand *Špinka,* genau so wie ich früher, daß bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht in Gegenwart von Luft Butter so stark angegriffen wird, daß sie einen unangenehmen Geschmack annimmt. So behandelte Butter hatte eine Giftwirkung auf Mäuse derart, daß sie weit eher starben, bevor Vitaminmangel ihren Tod verschulden konnte. Obgleich *Špinka* es für sehr wahrscheinlich hält, daß das Vitamin bei dieser Behandlung zerstört ist, rügt er, daß meine Versuche dies nicht überzeugend dartäten. Dies trifft nicht zu; denn in meiner Publikation gebe ich die Daten und Gewichtskurven für drei *Ratten* an, bei denen das Wachstum ausblieb, wenn sie mit bestrahlter Butter ernährt waren. Zwei dieser Tiere erhielten *über 3 Wochen hindurch* bestrahlte Butter und gewannen nach dieser Zeit ihr Wachstum zurück, wenn die belichtete Butter durch gewöhnliche Butter ersetzt wurde. Das dritte Tier starb, nachdem es *ungefähr 4 Wochen* mit der vorbehandelten Butter ernährt war, und zwar nicht, wie *Špinkas* Mäuse, infolge Giftwirkung, sondern wegen *Mangel an Vitamin A.* Dies Experiment beweist daher unwiderleglich, daß bei Bestrahlung von Butter mit ultraviolettem Licht in Luftgegenwart das fettlösliche Vitamin A zerstört wird. Wie ich später[3]) gezeigt habe, ist das von der Lampe erzeugte Ozon für diese Zerstörung *verantwortlich.*

---

[1]) *Joseph Špinka,* diese Zeitschr. **153**, 196, 1924.
[2]) *S. S. Zilva,* Biochem. Journ. **13**, 164, 1919.
[3]) *Derselbe,* ebendaselbst **14**, 740, 1920.

Über die Abhängigkeit der alkoholischen Gärung von der Wasserstoffionenkonzentration. I.

Von

Erik Hägglund und **Anne Marie Augustson.**

(Aus dem chemischen Institut der Akademie zu Åbo, Finnland.)

(Eingegangen am 5. Januar 1925.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Bestimmung der Gärungsgeschwindigkeit durch Messung der Kohlensäureentwicklung.

Vor etwa zehn Jahren hat der eine von uns in einer Arbeit „Hefe und Gärung in ihrer Abhängigkeit von Wasserstoff- und Hydroxylionen“ nebst einer kritischen Besprechung früherer Untersuchungen und durch neue Versuche die Kenntnis dieses Gebietes zu bereichern gesucht. Vor allen Dingen wurde dabei festgestellt, daß die Wirkung der Säuren in erster Linie auf den Gehalt derselben an Wasserstoffionen zurückzuführen war. Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß spezifische Einflüsse seitens der Säuren sich geltend machten.

Schon zu dem oben erwähnten Zeitpunkt waren weitere Untersuchungen geplant, wobei zunächst die Frage der günstigsten Aciditätsbedingungen unter verschiedenen Voraussetzungen näher studiert werden sollten, konnten aber wegen anderer Dispositionen nicht aufgenommen werden. In der dazwischenliegenden Zeit hat *Euler* in vollem Einverständnis mit dem einen von uns (*Hägglund*) mit einigen seiner Mitarbeiter dieses Gebiet durch einige wertvolle Untersuchungen bereichert[1]. Dadurch ist aber dieses Arbeitsgebiet keineswegs erschöpfend durchforscht. Sogar in einer so aktuellen und vitalen Frage, wie die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Gärung, herrscht noch eine gewisse Unsicherheit. Deshalb haben wir zunächst dieses Problem unter Anwendung von verschiedenen Säuren, und zwar in Puffermischungen, und von verschiedenen Gärungssubstraten aufgenommen, wobei wir zunächst die Gärungsgeschwindigkeit durch Messung der Kohlensäureentwicklung studierten.

---

[1]) *Euler* und *Heintze*, Vet. akad. Arkiv f. kemi 7, Nr. 21, 1917; *Myrbäck*, H. 139, 30, 1924.

Da nach der heutigen Anschauung die aufeinanderlaufenden Reaktionen der Zuckerspaltung bzw. Veresterung von einer Reihe von Enzymen, jedes für seine besondere Stufe, bedingt sind, für deren Wirksamkeit besondere p_H-Kurven mit charakteristischen Optimumgebieten wahrscheinlich gelten, bekommt man durch Messung der Kohlensäureentwicklung ein zuverlässiges Maß der Geschwindigkeit des Zuckerzerfalls von Anfang bis zu Ende, sofern keine Zwischenprodukte angehäuft werden. Das ist bei saurer Reaktion des Gärungssubstrats annähernd der Fall. Die dabei erhaltenen p_H-Kurven, d. h. die Beziehungen zwischen der relativen Gärungsgeschwindigkeit und der Wasserstoffionenkonzentration, müssen in dem Falle als Durchschnitts- oder Mittelzahlkurven sämtlicher Enzymreaktionen aufgefaßt werden. Demnach hat man auch zu erwarten, daß das Aussehen der betreffenden Kurven für verschiedene Substrate verschieden sein muß. Das haben wir auch gefunden.

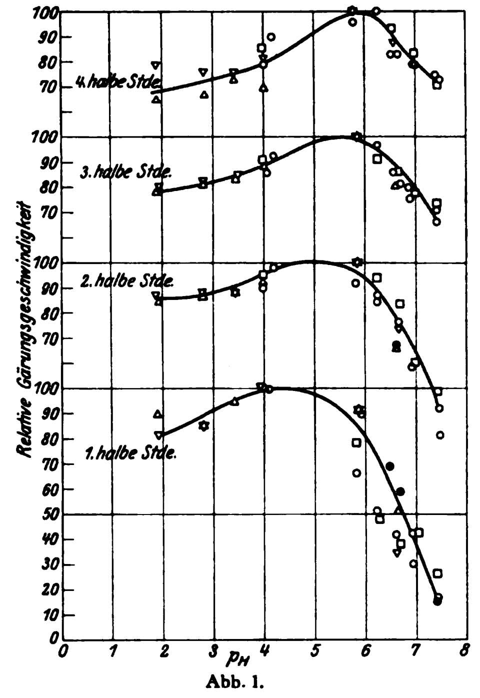


Abb. 1.

Für unsere Untersuchungen wählten wir folgende Säuren in Puffermischungen: Phosphorsäure, Milchsäure, Essigsäure und Brenztraubensäure.

Was zunächst die Phosphorsäure betrifft, fanden wir in den meisten Fällen eine Verschiebung des p_H-Optimums während der Gärung. Aus den in dem experimentellen Teil näher beschriebenen Versuchen Ia bis Id geht hervor, daß das Optimum der Wasserstoffionenkonzentration nach einer halben Stunde und nach 2 Stunden von etwa $p_H = 4{,}5$ auf $p_H = 6$ verschoben worden ist (Abb. 1). Nun ändert sich auch die Acidität während der Gärung auf Grund des bekannten Säureproduktionsvermögens der Hefe. Die angeführten p_H-Werte beziehen sich auf den Mittelwert von p_H unmittelbar nach dem Hefezusatz und nach 2 Stunden Gärung. Wie aus den Zahlen hervorgeht, ist die Veränderung der Acidität auf Grund der Säureproduktion wenigstens im Bereich der Optimalwirkung meistens nicht groß und auf alle Fälle

von ganz anderer Größenordnung, als einfach dadurch die erwähnte Verschiebung des p_H-Optimums erklärt werden könnte. Da sich aber der Gärungsvorgang größtenteils innerhalb der Zelle vollzieht, ist es durchaus denkbar, daß dort eine andere, und zwar größere Wasserstoffionenkonzentration als in der umgebenden Lösung herrscht. Es erscheint aus diesem Grunde und aus anderen, die wir unten angeben werden, berechtigt, ja notwendig, die anfängliche p_H-Konzentration $= 4,5$ für Phosphorsäure als Optimum anzusehen. Es ist in Anschluß an diese Überlegung geeignet, auf die Versuche der Gärung der Maltose hinzuweisen. Aus den Kurvenzeichnungen der Abb. 3 geht hervor, daß das p_H-Optimum der Gärung in diesem Falle während 2 Stunden Gärung konstant bei $p_H = 4,5$ bleibt. Es ergibt sich ferner, daß der Säurezuwachs bei der Maltosegärung entweder gar keiner, oder verhältnismäßig sehr gering ist. Glucose und Rohrzucker[1]) geben aber bei der Gärung, wie erwähnt, eine deutliche Verschiebung.

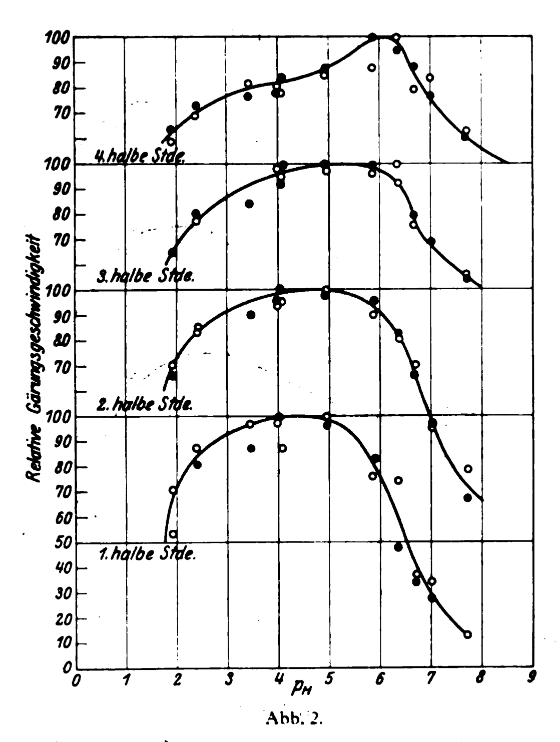


Abb. 2.

Um zu sehen, ob eine Änderung des Aussehens der p_H-Kurven bei vorhergehender Hefewaschung mit Phosphatmischungen eintreten würde, wurde auch die Versuchsreihe II ausgeführt. Es ist offenbar, daß eine Veränderung *nicht* eingetreten ist. Auch in dem Falle trat eine Verschiebung von $p_H = 4,5$ auf $p_H = 6$ ein (Versuchsreihe IIa und IIb). Das Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Resultaten, die in der obenerwähnten Monographie enthalten sind, aus welchen hervorgeht, daß eine Vorbehandlung der Hefe mit Säurelösungen ohne Zucker innerhalb gewisser Grenzen auf die Hemmung der Gärtätigkeit der Hefe praktisch ohne Einfluß ist (Abb. 2).

[1]) Bei der Vergärung von Rohrzucker wurde dasselbe Resultat wie mit Glucose erhalten und wird deshalb nicht angeführt.

Die oben erwähnte Verschiebung des Gärungsoptimums ist offenbar von noch einem Umstand, nämlich von dem physiologischen Zustand der Hefe abhängig. Eine Hefe von derselben Rasse, aber von einer anderen Sendung stammend, gab Optimumwerte, die mit der Zeit eine kleine Verschiebung zeigen, welche aber unter Berücksichtigung des während der Gärung eingetretenen Säurezuwachses belanglos ist. In dem Falle liegt das Optimum *während der ganzen Zeit* (2 Stunden) bei etwa $p_H = 4,5$ (Versuchsreihe IVa und IVb).

Bei den Gärungsversuchen mit *Milchsäure-Natriumlactat* ergibt sich für Lösungen von Rohrzucker, Glucose und Maltose ein Optimum bei etwa $p_H = 4,5$. Als Beispiel seien die Kurven für Glucoselösungen angegeben (Abb. 4). Die punktierte Kurve repräsentiert die Gärungskurve unter Berücksichtigung der tatsächlichen H˙-Ionenkonzentration. (Versuchsreihe Va bis Vb.)

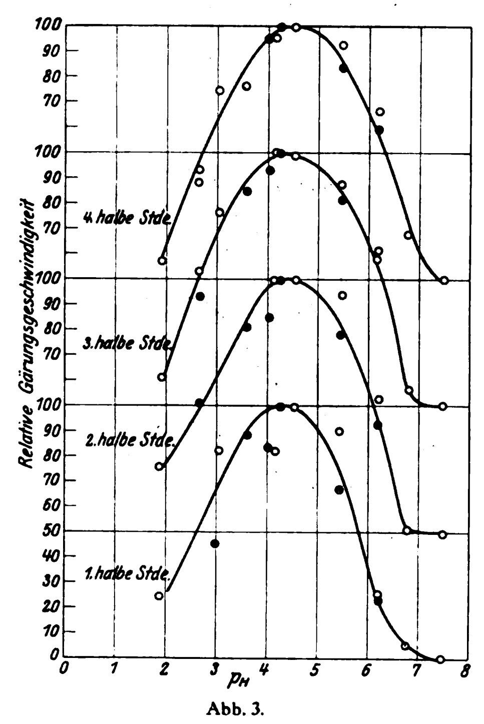


Abb. 3.

Werden die Kurven für Phosphorsäure und Milchsäure verglichen, so geht hervor, daß das Aussehen recht verschieden ist. Man merkt vor allen Dingen, daß bei den Phosphorsäure-Phosphatlösungen nach der alkalischen oder neutralen Seite eine deutliche Abschwächung eintritt, was bei den Gärungsversuchen mit Milchsäure nicht der Fall ist. Auf der entgegengesetzten sauren Seite ist das Verhalten genau umgekehrt. Die freie Milchsäure wirkt in höherem Grade als die freie Phosphorsäure auf die Gärung hemmend.

Mit gepufferten *Essigsäure*lösungen haben wir je nach der Konzentration des Acetats ein Gärungsoptimum bei $p_H = 4,5$ bis 5,5 gefunden. Je stärker die Acetatkonzentration ist, um so weiter wird das Optimum nach der alkalischen Seite verschoben, und zwar sofort bei Beginn der Gärung. Das Aussehen der Kurven ist charakteristisch. Sowohl nach der neutralen als nach der sauren Seite (und das letztere ganz besonders) tritt eine starke Abschwächung der Gärungsgeschwindigkeit ein. Die Gärung ist offenbar gegen freie Essigsäure

außerordentlich empfindlich. In verdünnten Acetatlösungen von 0,03 n tritt das Gärungsoptimum wie vorher bei $p_H = 4{,}5$ ein. In der Abb. 5 sind die Kurven für 0,15 n Acetatlösungen bei Vergärung von Glucose gegeben (Versuchsreihe VII).

Für *Brenztraubensäure-Natriumpyruvinatlösungen* ergibt sich nach 2 Stunden Gärung bei $p_H = 4$ bis 5 ein recht *breites* Optimum (Versuchsreihe Xa bis Xb).

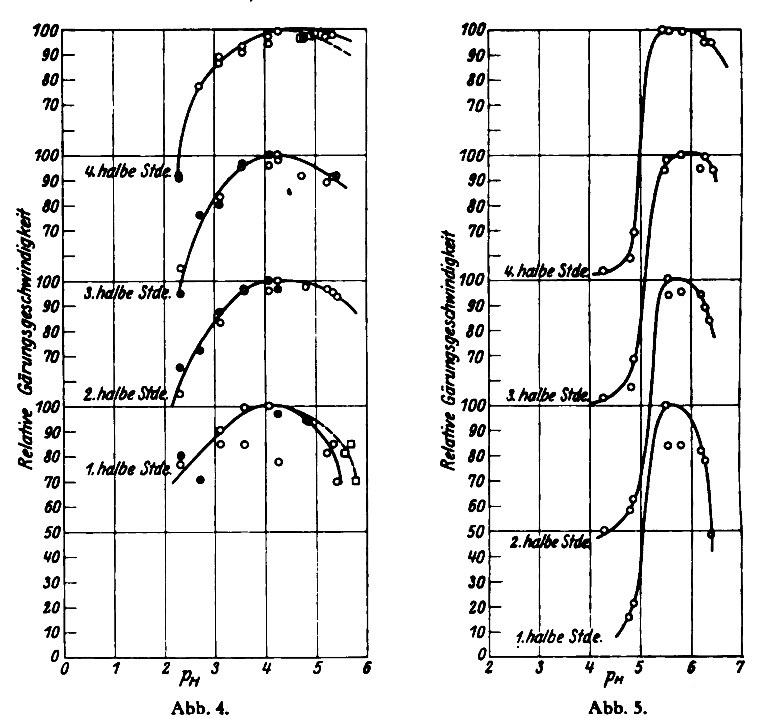


Abb. 4. Abb. 5.

Fassen wir die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen, so geht hervor, daß das Gärungsoptimum je nach der in dem Substrat anwesenden Säure und Zuckerart bei verschiedenem p_H eintreten kann, was auf Einflüsse spezifischer Art zurückzuführen ist. Sehen wir von letzteren ab, ergibt sich, daß die höchste Gärtätigkeit der lebenden Hefe bei $p_H = 4{,}5$ erreicht wird.

Experimenteller Teil.

Die Gärung wurde unter dauernder Schüttelung der Gärkolben und einem Vakuum von etwa 10 cm Hg ausgeführt. Die Temperatur betrug genau 30° und wurde mit einem elektrisch geheizten Thermostaten, in welchem die Kolben eintauchten, aufrecht erhalten. Die entwickelte Kohlensäure wurde in Büretten, die in zehntel Kubik-

zentimeter geteilt waren, aufgefangen. Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration geschah elektrometrisch. Die Aciditätsbestimmung wurde in der Gärlösung ohne Hefe, unmittelbar nach dem Hefezusatz und nach 2 Stunden Gärung ausgeführt. Die Hefe war eine obergärige Reinhefe von *Stockholms Norra Jästfabrik*, die uns von Herrn Direktor *H. Brahmer* wöchentlich frisch abgepreßt zugeschickt wurde. Die Hefe war immer von bester Güte. Wir möchten an dieser Stelle Herrn *Brahmer* für sein Entgegenkommen bestens danken.

Von jeder Versuchsreihe wurden mindestens zwei, zuweilen aber mehrere Versuche ausgeführt. Wie aus den Diagrammen und Tabellen hervorgeht, stimmen sie gut miteinander überein.

Versuchsreihe Ia.

Mischungen von 8 g Na_2HPO_4 und 8 g KH_2PO_4, je auf 400 ccm 5proz. Glucoselösung. Gäransatz: 20 ccm Lösung, 0,5 g Hefe.

Zeit	1	2	3	4	5	6
Kohlensäure in ccm.						
Nach 1/2 Std.	2,5	4,5	6,0	8,0	9,6	14,4
„ 1 „	5,0	7,8	10,8	13,6	14,6	16,0
„ 1 1/2 „	12,3	13,1	16,0	18,0	18,5	17,2
„ 2 „	14,2	15,5	16,2	19,4	19,0	17,5
Relative Geschwindigkeit.						
Nach 1/2 Std.	17,4	31,2	41,7	55,6	66,7	100,0
„ 1 „	31,3	48,8	67,5	85,0	91,3	100,0
„ 1 1/2 „	66,5	70,8	86,5	97,3	100,0	93,0
„ 2 „	73,1	79,9	83,5	100,0	97,9	90,2

p_H

	1	2	3	4	5	6
Acidität der Lösungen	8,51	7,09	6,73	6,38	6,01	4,47
Acidität unmittelbar nach Hefezusatz	7,81	7,06	6,73	6,29	5,89	4,21
Acidität nach 2 Std. Gärung	7,06	6,82	6,50	6,22	5,72	4,07
Acidität Mittelzahl während d. Gärung	7,44	6,94	6,61	6,26	5,80	4,14

Lösung A: 8 g Na_2HPO_4/400 ccm Glucoselösung.
Lösung B: 8 g KH_2PO_4/400 ccm Glucoselösung.
Mischung 1 = A; 2 = 4 A + 1 B; 3 = 3 A + 2 B; 4 = 2 A + 3 B; 5 = 1 A + 4 B; 6 = B.

Versuchsreihe Ib.

Zeit	1	2	3	4	5	6
Kohlensäure in ccm.						
Nach 1/2 Std.	1,8	4,6	5,5	7,4	9,7	10,8
„ 1 „	6,7	9,2	10,5	14,0	16,0	15,5
„ 1 1/2 „	11,6	14,3	15,5	—	18,9	16,6
„ 2 „	14,6	15,4	16,1	—	19,4	16,5

Versuchsreihe Ib. (Fortsetzung.)

Zeit	1	2	3	4	5	6
Relative Geschwindigkeit.						
Nach 1/2 Std.	16,6	42,6	50,9	68,5	89,8	100,0
„ 1 „	41,9	57,5	65,6	87,4	100,0	90,7
„ 1 1/2 „	61,4	75,6	82,0	—	100,0	87,9
„ 2 „	75,2	79,4	83,0	—	100,0	85,1

p_H

	1	2	3	4	5	6
Acidität der Lösungen	8,50	7,14	6,73	6,38	5,98	4,30
Acidität unmittelbar nach Hefezusatz	7,81	7,06	6,73	6,29	5,89	4,21
Acidität nach 2 Std. Gärung	7,08	6,85	6,63	—	5,79	3,88
Acidität Mittelzahl während d. Gärung	7,44	6,96	6,68	—	5,84	4,04

Versuchsreihe Ic.

Zeit	1	2	3	4	5	6
Kohlensäure in ccm.						
Nach 1/2 Std.	3,1	5,0	4,4	5,5	9,1	11,5
„ 1 „	8,0	10,6	12,0	15,2	16,3	15,6
„ 1 1/2 „	12,1	14,9	16,5	18,3	19,1	17,6
„ 2 „	14,0	16,5	18,3	19,4	19,6	16,8
Relative Geschwindigkeit.						
Nach 1/2 Std.	27,0	43,5	38,2	47,8	79,1	100,0
„ 1 „	49,0	65,0	73,6	93,3	100,0	95,6
„ 1 1/2 „	63,3	78,0	86,4	95,8	100,0	92,1
„ 2 „	71,3	84,2	93,4	99,0	100,0	85,7

p_H

	1	2	3	4	5	6
Acidität. Mittelzahl während der Gärung	7,43	6,99	6,66	6,26	5,81	4,00

Versuchsreihe Id.

Zeit	3	5	6	7	8	9
a) Kohlensäure in ccm.						
Nach 1/2 Std.	3,9	10,1	11,2	11,2	9,6	9,1
„ 1 „	12,0	16,5	15,5	14,6	14,4	14,3
„ 1 1/2 „	16,0	19,0	16,8	16,1	15,6	15,3
„ 2 „	16,5	18,7	16,1	14,2	14,2	14,8
b)						
Nach 1/2 Std.	5,5	10,8	11,9	11,2	10,2	10,7
„ 1 „	11,6	17,4	16,2	15,3	15,0	14,7
„ 1 1/2 „	15,6	19,1	17,1	15,9	15,4	14,9
„ 2 „	17,0	18,4	14,7	15,3	14,2	13,8

Versuchsreihe I d. (Fortsetzung.)

Zeit	3	5	6	7	8	9
a)			Relative Geschwindigkeit.			
Nach 1/2 Std.	34,8	91,1	100,0	79,4	85,7	81,2
„ 1 „	72,5	100,0	93,3	88,5	87,3	86,7
„ 1 1/2 „	80,5	100,0	88,4	84,7	82,1	80,5
„ 2 „	88,2	100,0	86,1	75,9	75,9	79,1
b)						
Nach 1/2 Std.	46,2	90,8	100,0	94,1	85,7	89,9
„ 1 „	66,7	100,0	93,1	87,9	86,2	84,5
„ 1 1/2 „	81,7	100,0	89,5	83,2	80,6	78,0
„ 2 „	92,4	100,0	79,9	83,1	77,1	75,0

p_H

		3	5	6	7	8	9
Acidität	der Lösungen	6,68	5,90	4,25	3,52	2,81	1,90
	unmittelbar nach Hefezusatz	6,66	5,90	4,21	3,52	2,79	1,90
	nach 2 Std. Gärung a	6,59	5,75	3,75	3,45	2,86	1,95
	nach 2 Std. Gärung b	6,53	5,75	3,80	3,36	2,85	1,95
	Mittelzahl während d. Gärung a	6,62	5,83	3,98	3,48	2,82	1,92
	Mittelzahl während d. Gärung b	6,60	5,83	4,00	3,44	2,82	1,92

Zur Erreichung höherer H˙-Ionenkonzentration wurde zu den Mischungen H_3PO_4 zugesetzt. Das ist auch in den folgenden Versuchen mit Phosphorsäure-Phosphatmischungen der Fall.

Versuchsreihe II.

3 Stunden Vorbehandlung mit Phosphat-Phosphorsäurelösungen.

Zeit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
a)				Kohlensäure in ccm.							
1/2 Stunde	1,7	4,3	4,7	9,4	9,6	12,6	11,0	12,3	12,2	11,0	9,0
1 „	5,3	8,2	10,8	14,5	16,2	18,0	17,1	16,8	18,2	15,2	12,7
1 1/2 Stunden	10,0	13,5	15,0	19,8	18,9	19,3	18,7	19,2	16,9	15,3	12,9
2 „	12,9	17,1	17,2	20,6	18,0	17,4	15,9	16,5	16,7	14,1	12,2
b)											
1/2 Stunde	—	3,6	5,8	7,6	11,0	12,7	9,9	13,2	11,6	10,7	7,1
1 „	3,3	8,6	11,9	15,1	17,7	18,1	18,4	17,5	16,6	15,3	12,2
1 1/2 Stunden	11,1	13,9	16,1	18,6	20,1	20,3	20,1	18,5	17,2	16,4	13,2
2 „	12,2	15,4	17,8	19,0	20,3	17,7	17,0	15,6	15,5	14,7	12,6
a)				Relative Geschwindigkeit.							
1/2 Stunde	13,5	34,1	37,3	74,6	76,2	100,0	87,2	97,6	96,6	87,3	71,4
1 „	28,9	45,5	60,0	80,5	90,0	100,0	95,0	93,3	—	84,4	70,5
1 1/2 Stunden	55,6	68,2	75,2	100,0	95,4	97,5	94,4	97,0	85,0	77,3	65,1
2 „	62,6	83,1	83,5	100,0	87,4	84,4	77,1	80,1	81,0	68,5	58,7
b)											
1/2 Stunde	—	27,3	43,9	57,6	83,3	96,2	75,0	100,0	87,9	81,1	53,8
1 „	17,8	46,7	64,7	82,1	95,7	98,3	100,0	95,1	90,2	83,1	66,3
1 1/2 Stunden	54,7	68,5	79,3	91,6	99,1	100,0	99,1	91,1	84,7	80,8	65,0
2 „	60,1	75,9	87,7	93,6	100,0	87,1	83,2	76,8	76,3	72,4	62,1

p_H

Acidität	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
unmittelb. n. Hefezusatz	8,00	7,21	6,75	6,44	5,98	5,22	4,40	4,30	3,48	2,44	1,93
nach 2 Std. Gärung . .	7,37	6,91	6,48	6,26	5,79	4,59	3,75	3,70	3,42	2,36	1,93
Mittelzahl während d. Gärung . .	7,69	7,01	6,67	6,35	5,88	4,95	4,08	4,00	3,45	2,40	1,93

Versuchsreihe III.

Phosphorsäure-K, Na-Phosphatmischungen (vgl. Versuchsreihe I).
5proz. Maltoselösung.

Zeit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
a)				Kohlensäure in ccm.						
Nach 1/2 Stunde .	—	0	0,4	2,0	6,6	7,3	6,5	6,5	—	1,8
„ 1 „ .	—	0	0,1	5,7	10,1	10,7	10,7	—	—	1,5
„ 1 1/2 Stunden .	—	0	0,8	7,5	10,9	12,2	12,3	9,4	6,5	1,4
„ 2 „ .	—	0	2,4	8,7	12,1	13,0	12,4	9,8	5,7	1,0
b)										
Nach 1/2 Stunde .	—	—	—	1,8	5,3	7,9	6,6	7,0	3,6	—
„ 1 „ .	—	—	—	5,2	9,3	12,1	10,3	9,8	6,2	—
„ 1 1/2 Stunden .	—	—	—	7,9	11,1	13,5	12,6	11,5	6,0	—
„ 2 „ .	—	—	—	8,2	11,6	13,7	13,1	10,5	5,3	—
a)				Relative Geschwindigkeit.						
Nach 1/2 Stunde .	—	0	5,6	25,3	90,4	100,0	82,3	82,3	—	24,5
„ 1 „ .	—	0	1,8	53,2	94,4	100,0	100,0	—	—	26,3
„ 1 1/2 Stunden .	—	0	6,5	61,0	88,6	99,2	100,0	76,4	52,8	11,4
„ 2 „ .	—	0	18,4	67,0	93,1	100,0	95,4	75,4	43,8	7,7

b)

Zeit	1	2	3	4	5	6'	7'	8'	9	10
Nach 1/2 Stunde .	—	—	—	22,8	67,1	100,0	83,5	88,6	45,6	—
„ 1 „ .	—	—	—	43,0	76,8	100,0	85,1	81,0	51,2	—
„ 1 1/2 Stunden .	—	—	—	58,5	82,2	100,0	93,3	85,2	43,8	—
„ 2 „ .	—	—	—	59,4	84,7	100,0	95,6	76,7	38,7	—

p_H

Acidität	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
unmittelbar nach Hefezusatz . .	—	7,49	6,83	6,23	5,54	5,29	4,42	3,06	2,66	1,93
nach 2 Std. Gärung	—	7,49	6,74	6,19	5,38	4,89	3,87	3,06	2,66	1,93
Mittelzahl	—	7,49	6,78	6,21	5,46	5,04	4,15	3,06	2,66	1,93

Acidität	1	2	3	4	5	6'	7'	8'	9	10
unmittelbar nach Hefezusatz . .	—	—	—	—	—	4,40	4,18	3,61	—	—
nach 2 Std. Gärung	—	—	—	—	—	4,11	3,87	3,53	—	—
Mittelzahl	—	—	—	—	—	4,25	4,02	3,56	—	—

Versuchsreihe IV.

Phosphorsäure-, K-, Na-Phosphatmischungen (0,15 n) 5proz. Rohrzuckerlösungen.

Zeit	1	2	3	4	5	6	7	8
a)	Kohlensäure in ccm.							
Nach ½ Stunde	—	4,5	8,0	10,9	12,5	12,6	13,1	—
„ 1 „	—	10,2	13,8	16,1	17,2	16,5	16,7	—
„ 1½ Stunden	—	14,1	16,1	17,6	18,0	17,6	17,6	—
„ 2 „	—	15,1	17,1	18,2	18,8	18,0	18,0	—
b)								
Nach ½ Stunde	0	—	—	10,0	12,9	12,9	13,0	11,2
„ 1 „	4,1	—	—	15,4	16,5	16,8	16,6	15,9
„ 1½ Stunden	10,2	—	—	17,9	18,3	17,6	17,6	16,7
„ 2 „	12,7	—	—	18,6	19,2	18,4	18,4	16,6
a)	Relative Geschwindigkeit.							
Nach ½ Stunde	—	34,3	61,0	83,2	95,4	96,2	100,0	—
„ 1 „	—	59,3	80,2	93,5	100,0	95,9	97,1	—
„ 1½ Stunden	—	78,3	89,4	97,8	100,0	97,8	97,8	—
„ 2 „	—	80,3	91,0	96,8	100,0	95,7	95,7	—
b)								
Nach ½ Stunde	0	—	—	77,0	99,2	99,2	100,0	86,1
„ 1 „	24,2	—	—	91,6	98,2	100,0	98,8	94,4
„ 1½ Stunden	55,7	—	—	97,8	100,0	96,1	96,1	91,2
„ 2 „	66,1	—	—	96,8	100,0	95,8	95,8	86,4

p_H

	1	2	3	4	5	6	7	8
Acidität: der Lösungen	8,74	7,05	6,57	6,08	5,30	4,44	4,29	4,00
Acidität: unmittelbar n. Hefezusatz	8,65	7,05	6,57	6,08	5,30	4,44	4,29	4,00
Acidität: nach 2 Stunden Gärung	7,03	6,82	6,41	5,68	4,07	3,58	3,51	—
Acidität: Mittelzahl während der Gärung	7,84	6,93	6,49	5,88	4,69	4,01	3,90	—

Versuchsreihe V.

Milchsäure-Natriumlactatmischungen, etwa 0,15 n 5proz. Glucoselösung.

Zeit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
a)	Kohlensäure in ccm.									
Nach ½ Stunde	7,1	8,6	8,2	9,5	7,9	10,1	8,6	8,6	—	7,8
„ 1 „	13,0	13,3	13,4	13,6	13,9	13,6	13,5	12,1	—	9,7
„ 1½ Stunden	14,3	14,3	14,0	14,3	15,6	15,0	14,9	13,4	—	8,6
„ 2 „	—	14,5	14,4	14,2	14,8	14,0	13,5	12,9	—	6,0
b)										
Nach ½ Stunde	—	—	—	—	10,2	10,5	10,5	9,5	7,4	8,4
„ 1 „	—	—	—	—	13,2	13,7	13,2	12,0	9,9	9,0
„ 1½ Stunden	—	—	—	—	14,7	15,0	14,6	13,2	11,4	6,8
„ 2 „	—	—	—	—	14,7	14,3	13,8	13,1	11,3	6,0

Versuchsreihe V. (Fortsetzung).

Zeit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
a)				Relative Geschwindigkeit.						
Nach 1/2 Stunde .	70,3	85,1	81,2	94,0	78,2	100,0	85,1	85,1	—	77,2
„ 1 „ .	93,6	95,7	96,4	97,8	100,0	97,8	97,1	87,0	—	69,9
„ 1 1/2 Stunden.	91,6	91,6	89,7	91,6	100,0	96,1	95,5	83,3	—	55,1
„ 2 „ .	—	97,9	97,2	95,9	100,0	94,6	91,2	87,1	—	40,5
b)										
Nach 1/2 Stunde .	—	—	—	—	97,1	100,0	100,0	90,5	70,5	80,0
„ 1 „ .	—	—	—	—	96,3	100,0	96,3	87,6	72,3	65,7
„ 1 1/2 Stunden.	—	—	—	—	98,0	100,0	97,3	80,0	76,0	45,3
„ 2 „ .	—	—	—	—	100,0	97,3	93,2	89,1	76,9	41,5

p_H

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Acidität der Lösungen . .	7,28	6,17	5,76	4,96	4,27	4,10	3,58	3,10	2,70	2,30
Acidität unmittelbar nach Hefezusatz . .	5,77	5,67	5,55	4,84	4,26	4,09	3,59	3,10	2,70	2,30
Acidität nach 2 Std. Gärung	5,03	4,98	4,90	4,73	4,25	4,05	3,57	3,10	2,70	2,30
Acidität Mittelzahl währd. der Gärung . .	5,40	5,32	5,22	4,78	4,25	4,07	3,58	3,10	2,70	2,30

Versuchsreihe VI.

Milchsäure-Natriumlactatlösungen, etwa 0,15 n 5proz. Rohrzuckerlösung.

Zeit	1	2	3	4	5	6	7
a)			Kohlensäure in ccm.				
Nach 1/2 Stunde	11,3	11,7	11,7	10,7	8,7	—	5,0
„ 1 „	16,7	17,0	16,6	16,6	13,0	—	1,3
„ 1 1/2 Stunden	19,0	18,2	18,9	18,4	14,1	—	0,5
„ 2 „	19,5	19,0	19,4	19,3	12,4	—	0,2
b)							
Nach 1/2 Stunde	11,2	12,1	11,0	10,2	9,1	6,2	—
„ 1 „	17,1	16,7	16,2	16,2	12,9	3,3	—
„ 1 1/2 Stunden	19,0	18,7	18,6	17,7	13,1	2,6	—
„ 2 „	19,6	19,2	18,6	17,9	12,4	2,0	—
a)			Relative Geschwindigkeit.				
Nach 1/2 Stunde	96,6	100,0	100,0	91,5	74,4	—	42,7
„ 1 „	98,2	100,0	97,6	97,6	76,5	—	7,6
„ 1 1/2 Stunden	100,0	95,8	99,5	96,8	74,2	—	2,6
„ 2 „	100,0	97,4	99,5	99,0	63,6	—	1,0
b)							
Nach 1/2 Stunde	92,6	100,0	90,9	84,3	75,2	51,2	—
„ 1 „	100,0	97,7	94,7	94,7	75,4	17,3	—
„ 1 1/2 Stunden	100,0	98,4	98,0	93,2	69,0	13,7	—
„ 2 „	100,0	98,0	94,9	91,3	63,3	12,0	—

p_H

	1	2	3	4	5	6	7
Acidität der Lösungen	5,63	4,51	4,07	3,50	2,88	2,50	2,25
Acidität unmittelbar nach Hefezusatz	5,60	4,51	4,07	3,50	2,88	2,50	2,25
Acidität nach 2 Stunden Gärung	4,77	4,35	3,94	3,46	2,88	2,50	2,25
Acidität Mittelzahl während der Gärung	5,19	4,43	4,00	3,48	2,88	2,50	2,25

Versuchsreihe VII.

Essigsäure-Natriumacetatmischungen, etwa 0,15 n 5proz. Glucoselösung.

Zeit	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Kohlensäure in ccm.									
Nach 1/2 Stunde	4,9	7,9	8,2	8,5	8,5	10,1	2,2	1,6	1,8
„ 1 „	14,4	15,2	16,1	16,2	16,1	17,0	2,3	1,5	0,1
„ 1 1/2 Stunden	18,0	18,9	18,0	19,1	18,5	18,0	3,5	1,5	0,5
„ 2 „	18,9	18,9	19,6	19,8	20,0	20,0	3,6	1,7	0,9
Relative Geschwindigkeit.									
Nach 1/2 Stunde	48,5	78,2	81,6	84,1	84,1	100,0	21,7	15,8	18,8
„ 1 „	84,7	89,4	94,7	95,3	94,7	100,0	12,7	8,8	0,6
„ 1 1/2 Stunden	94,3	98,9	94,3	100,0	96,8	94,3	18,4	7,8	3,0
„ 2 „	94,5	94,5	98,0	99,0	100,0	100,0	19,0	8,5	4,5

p_H

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Acidität der Lösungen	7,18	7,01	6,68	5,98	—	—	—	—	—
Acidität unmittelbar nach Hefezusatz	6,83	6,65	6,54	5,93	5,59	5,53	4,88	4,79	4,29
Acidität nach 2 Stunden Gärung	5,96	5,91	5,87	5,68	5,45	5,41	4,88	4,79	4,29
Acidität Mittelzahl während der Gärung	6,40	6,28	6,21	5,81	5,52	5,47	4,88	4,79	4,29

Versuchsreihe VIII.

Essigsäure-Natriumacetatmischungen (0,08 n NaAc) 5proz. Rohrzuckerlösung.

Zeit	1	2	3	4	5	6	7	8
a) **Kohlensäure in ccm.**								
Nach 1/2 Stunde	—	13,0	12,5	8,8	4,0	2,2	1,6	—
„ 1 „	—	18,0	19,6	18,5	11,1	3,0	1,4	—
„ 1 1/2 Stunden	—	20,5	21,5	22,3	15,7	3,5	1,5	—
„ 2 „	—	19,9	22,0	22,8	17,7	3,7	1,5	—
b)								
Nach 1/2 Stunde	12,1	13,2	11,6	8,4	4,0	—	—	1,6
„ 1 „	17,7	19,4	18,8	18,0	10,0	—	—	0,6
„ 1 1/2 Stunden	20,0	21,3	21,3	21,0	15,0	—	—	0,8
„ 2 „	20,2	21,6	21,4	21,3	16,4	—	—	1,0

Versuchsreihe VIII. (Fortsetzung.)

Zeit	1	2	3	4	5	6	7	8
a)	Relative Geschwindigkeit.							
Nach $^1/_2$ Stunde	—	100,0	96,1	67,7	30,7	17,0	12,3	—
„ 1 „	—	91,8	100,0	94,4	56,6	15,3	7,1	—
„ $1^1/_2$ Stunden	—	91,9	96,4	100,0	70,9	15,7	6,7	—
„ 2 „	—	87,3	96,5	100,0	77,6	16,2	6,6	—
b)								
Nach $^1/_2$ Stunde	91,6	100,0	88,0	63,6	30,3	—	—	12,1
„ 1 „	91,2	100,0	97,0	92,8	51,5	—	—	3,1
„ $1^1/_2$ Stunden	93,9	100,0	100,0	98,6	71,3	—	—	3,8
„ 2 „	93,5	100,0	99,1	98,6	75,9	—	—	4,6

p_H

	1	2	3	4	5	6	7	8
Acidität: der Lösungen	6,55	5,90	5,11	4,72	4,31	4,15	3,76	2,91
unmittelbar nach Hefezusatz	6,05	5,90	5,11	4,72	4,39	4,15	3,76	2,91
nach 2 Stunden Gärung	5,35	5,08	4,90	4,60	4,35	4,13	3,78	3,08
Mittelzahl während der Gärung	5,70	5,49	5,00	4,66	4,37	4,14	3,77	3,00

Mischungen: 1: A = 0,08 n Na-Acetat; 2: 5 A + 0,5 B; 3: 5 A + B; 4: 4 A + 2 B; 5: 3 A + 3 B; 6: 2 A + 4 B; 7: A + 5 B; 8: 0,08 n Essigsäure = B.

Versuchsreihe IX.

Essigsäure-Natriumacetatmischungen, 0,03 n 5proz. Rohrzuckerlösung.

Zeit	1	2	3	4	5	6
a)	Kohlensäure in ccm.					
Nach $^1/_2$ Stunde	10,0	9,8	10,1	7,7	3,9	1,7
„ 1 „	16,7	17,0	17,8	16,3	6,8	0,3
„ $1^1/_2$ Stunden	19,1	19,7	19,9	20,5	9,6	1,9
„ 2 „	20,0	20,0	20,9	20,7	11,3	2,7
b)						
Nach $^1/_2$ Stunde	10,7	11,2	10,1	8,8	3,8	1,4
„ 1 „	16,5	17,1	17,8	17,1	6,4	1,2
„ $1^1/_2$ Stunden	19,3	19,2	20,4	20,0	9,0	1,7
„ 2 „	20,1	19,4	21,1	20,1	10,4	2,9
a)	Relative Geschwindigkeit.					
Nach $^1/_2$ Stunde	99,0	97,0	100,0	76,2	38,6	15,8
„ 1 „	93,8	95,5	100,0	91,6	38,2	2,6
„ $1^1/_2$ Stunden	93,1	96,1	97,1	100,0	46,8	9,4
„ 2 „	95,7	95,7	100,0	99,0	54,0	12,9
b)						
Nach $^1/_2$ Stunde	95,6	100,0	90,2	78,6	33,9	12,4
„ 1 „	92,7	96,1	100,0	96,1	36,0	6,7
„ $1^1/_2$ Stunden	94,6	94,0	100,0	98,0	44,1	8,3
„ 2 „	95,6	91,9	100,0	95,6	49,3	13,8

p_H

		1	2	3	4	5	6
Acidität	der Lösungen	6,82	5,98	4,84	4,52	3,87	3,11
	unmittelbar nach Hefezusatz	6,37	5,57	4,82	4,50	3,87	3,11
	nach 2 Stunden Gärung	5,09	4,95	4,49	4,17	3,57	3,37
	Mittelzahl während der Gärung	5,73	5,26	4,65	4,33	3,72	3,24

Versuchsreihe X.

Brenztraubensäure-Natriumpyruvinatlösungen, 0,11 n 5 proz. Glucoselösung.

Zeit	1	2	3	4	5	6	7
a)	Kohlensäure in ccm.						
Nach 1/2 Stunde	—	11,8	—	—	11,0	9,8	8,5
„ 1 „	—	20,1	—	—	18,5	13,3	7,2
„ 1 1/2 Stunden	—	20,4	—	—	21,4	15,8	6,0
„ 2 „	—	20,9	—	—	21,7	17,3	2,9
b)							
Nach 1/2 Stunde	13,4	13,1	13,1	11,2	10,7	8,3	—
„ 1 „	18,2	18,6	18,3	18,7	18,7	13,1	—
„ 1 1/2 Stunden	20,9	21,3	21,8	21,7	21,8	16,2	—
„ 2 „	22,2	22,2	22,3	22,3	22,3	18,5	—
a)	Relative Geschwindigkeit.						
Nach 1/2 Stunde	—	100,0	—	—	94,3	83,0	72,0
„ 1 „	—	100,0	—	—	92,4	66,1	35,6
„ 1 1/2 Stunden	—	95,3	—	—	100,0	73,9	28,0
„ 2 „	—	96,3	—	—	100,0	79,7	13,4
b)							
Nach 1/2 Stunde	100,0	97,7	97,7	83,6	79,8	61,9	—
„ 1 „	97,3	99,4	97,9	100,0	100,0	70,1	—
„ 1 1/2 Stunden	95,9	97,7	100,0	99,5	100,0	74,3	—
„ 2 „	99,6	99,6	100,0	100,0	100,0	82,9	—

p_H

	1	2	3	4	5	6	7
Acidität nach 2 Stdn. Gärung	5,23	5,10	4,73	4,00	3,77	2,86	1,97

Untersuchungen über die hormonale Regulation des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels.

I. Mitteilung:

Die Bedeutung von Adrenalin und Insulin für die Verwertung von Traubenzucker durch die Warmblüterzelle.

Von

Alfred Gottschalk.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 5. Januar 1925.)

In früheren Untersuchungen haben *Gottschalk* und *Pohle*[1]) ausgeführt, daß die nach Adrenalin bei Warmblütern auftretende Hyperglykämie die Resultante vermehrter Glykogendiastasierung und verminderter Glucoseverwertung ist. Die Adrenalinhyperglykämie wurde infolgedessen als „*Zuckerhochstauung*" gekennzeichnet. Die vermehrte Diastasierung des Reservekohlenhydrats der Leberzelle nach Adrenalininjektion — das Muskelglykogen nimmt dabei nur in geringfügigem Maße ab (*Falta* und *Priestley*, *Frank* und *Isaac*, *Michand*) — wurde auf Beeinflussung der Reaktionskinetik Diastase ⟶ Glykogen[2]) auf dem Wege über Änderung des physiko-chemischen Zustandes des Zellinnern zurückgeführt[3]) und gezeigt, daß die nach Adrenalinapplikation im Leberstromgebiet von uns nachgewiesene Erhöhung der

[1]) *A. Gottschalk* und *E. Pohle*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **95**. 64 u. 75, 1922; Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 26; Verhandl. d. deutsch. Ges. f. inn. Med., Wiesbaden 1922, S. 397.

[2]) Vgl. hierzu auch *O. Nasse*, Arch. f. d. ges. Physiol. **2**, 104, 1869; *E. J. Lesser*, diese Zeitschr. **102**, 304, 1920; **119**, 108, 1921.

[3]) Die diastatische Wirkung des Adrenalins ist an die Zellstruktur gebunden (*I. Bang*, diese Zeitschr. **49**, 81, 1913).

Wasserstoffionenkonzentration[1]), auf elektrometrischem Wege ermittelt, an der Erzeugung jener Zustandsänderungen der Leberzelle mitwirkt. Ungeklärt blieben die Gründe für die mangelnde intermediäre Verwertung der durch den Vorgang gesteigerter Glykogenolyse in vermehrter Menge entstehenden und im Blute kreisenden Glucose.

Wir haben versucht, mit Hilfe der Anordnung, die sich des *Neuberg*schen Abfangverfahrens bedient, einen Einblick in die nach Adrenalinzufuhr im Zuckerumsatz von Warmblüterzellen obwaltenden Verhältnisse zu gewinnen.

Neuberg und *Gottschalk*[2]) ist es durch Anwendung des wasserunlöslichen und daher die Zellen kaum schädigenden Calciumsulfits ($CaSO_3$) gelungen, die regelmäßige Bildung von Acetaldehyd durch überlebende Leber- und Muskelzellen warmblütiger Tiere zu erweisen, quantitativ zu verfolgen und auf Kohlenhydrat als Muttersubstanz zurückzuführen. Diese Acetaldehydproduktion ist an die Anwesenheit von Sauerstoff geknüpft; sie stellt einen obligat oxydativen Prozeß dar[3]). Die von uns angewandte Methodik gestattet, die Wirkung eines Hormons auf den oxydativen Kohlenhydratabbau in eindeutiger Weise zu bestimmen. Die nachfolgenden Versuche zeigen, daß Adre-

---

[1]) So konnten wir belegen, daß bei Kaninchen nach Adrenalinzufuhr die Wasserstoffionenkonzentration im Gebiet der Lebervene z. B. von $p_H = 7{,}58$ nach $p_H = 7{,}18$ verschoben wurde (Versuch 14, Mitteilung I, *Gottschalk-Pohle*, l. c.). *J. P. Peters* und *H. R. Geyelin* (Journ. of biol. Chem. **81**, 471) sowie *A. L. Tatum* (Journ. of Pharm. and exper. Therap. **17**, 395, 1921) haben bei Warmblütern unter der Einwirkung von Adrenalin eine Hypokapnie im Blute beobachtet. *F. Kornfeld* und *H. Elias* (diese Zeitschr. **133**, 192, 1922) haben diesen Befund bestätigt, indem sie bei Kaninchen nach Adrenalinzufuhr regelmäßig eine mehrere Stunden währende Herabsetzung des CO_2-Bindungsvermögens des Blutes beobachteten. Späterhin haben *A. Bornstein* und *W. Griesbach* (Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **37**, 33, 1923) auch im Adrenalindurchblutungsversuch an Hundelebern eine allerdings nicht regelmäßig auftretende Abnahme der CO_2-Kapazität des Gesamtblutes beschrieben. Hinsichtlich des Zusammenhangs von lokaler Acidosis und Hyperglykämie haben wir die Vorstellung geäußert, daß die Adrenalinhyperglykämie zwar kein Säurediabetes ist, daß aber wohl die Säuerung im Leberstromgebiet, die unter dem Einfluß der nach Adrenalinzufuhr dort herrschenden Asphyxie zustande kommt, ein stark *begünstigendes Moment* für die Reaktion zwischen Glykogen und Diastase in der Leberzelle darstellt. Diese Anschauung wird auch von *L. Pollak* (Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk., S. 337, Berlin 1923) geteilt; vgl. hierzu auch *E. Abderhalden* und *E. Wertheimer*, Arch. f. d. ges. Physiol. **206**, 451, 1924.

[2]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 31; diese Zeitschr. **146**, 164 und 185, 1924; **151**, 169, 1924; vgl. die Zusammenfassung von *A. Gottschalk*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 17.

[3]) *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **146**, 582, 1924.

nalin in spezifischer Weise in jene Vorgänge eingreift, die unter Aufnahme von Sauerstoff zum Einsturz des Zuckergerüstes führen.

Versuchsanordnung: 40 bis 50 g Leber- bzw. Muskelbrei frisch getöteter Kaninchen wurden in der dreifachen Menge körperwarmer, phosphatgepufferter Tyrodelösung ($p_H = 7,0$) suspendiert und zu dem Gemisch 3,0 g frisch gefälltes Calciumsulfit sowie 0,8 g Rivanol als Antisepticum gefügt. Zu dem Parallelansatz wurde Suprarenin. hydrochl. Höchst a. M. in wechselnder Menge gegeben (vgl. Tabelle I). Beide Ansätze wurden unter öfterem Schütteln und Lüften 24 Stunden bei 40° Brutschranktemperatur aufbewahrt und alsdann in der früher näher beschriebenen Weise[1]) aufgearbeitet. Die Titration im Enddestillat wurde mit Hilfe des Hydroxylaminsulfatverfahrens ausgeführt.

In Vorversuchen überzeugten wir uns zunächst davon, daß Adrenalin anwesenden Acetaldehyd in keiner Weise beeinflußt.

Beispiel: 5 ccm 0,264 proz. Acetaldehydlösung (= 0,0132 g Acetaldehyd) + 100 ccm Aqua dest. + 1,0 ccm Suprarenin. hydrochl. Höchst + 3,0 g $CaSO_3$ bei 40°.

Nach 24 Stunden Aufarbeitung und quantitative Bestimmung. Acetaldehyd = 0,0128 g.

Tabelle I.

Art und Menge des Gewebebreies	Acetaldehyd in der Kontrolle mg	Dem Parallelansatze zugefügte Menge von Supraren. hydrochl. (1,0 : 1000,0) ccm	Acetaldehyd im Hormonversuche mg
40 g Leber	3,74	0,20	1,87
44 g „	2,85	0,50	0,66
41 g „	3,59	0,75	0,42
50 g „	3,16	1,00	0,31
48 g „	2,68	1,00	0,33
50 g Muskel	1,54	0,50	0,80
		1,00	0,33

Das Hormon der Nebenniere beeinträchtigt also die Bildung des Oxydationsproduktes Acetaldehyd; und zwar handelt es sich in Abhängigkeit von der angewandten Konzentration um partielle oder vollständige Unterdrückung des gemessenen Oxydationsprozesses[1]).

Durch diese Versuchsergebnisse ist mit Hilfe direkter Methode gezeigt, daß Adrenalin den oxydativen Zuckerabbau hemmt. *Bornstein* und *Griesbach*[2]) haben im Durchblutungsexperiment an glykogen-

[1]) Vgl. auch *A. Gottschalk*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 30.
[2]) *A. Bornstein* und *W. Griesbach*, l. c.

haltigen Hundelebern nachgewiesen, daß Adrenalin auch die anaerob erfolgende Milchsäurebildung aus Glucose erheblich herabmindert. Die Wirkung des Adrenalins auf den Zuckerumsatz der Leberzelle läßt sich demnach folgendermaßen definieren: Adrenalin bedingt vermehrte Diastasierung des Zellglykogens. Der weitere Abbau des auf diese Weise in reichlicher Menge entstehenden Depolymerisationsprodukts Glucose ist — in quantitativer Abhängigkeit von der Konzentration anwesenden Adrenalins — gehemmt, und zwar sowohl die anaerobe Milchsäurebildung wie die oxydative Verarbeitung.

Damit ist die Adrenalinhyperglykämie in Beziehung zu Störungen der Regulation des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels gebracht. Die physiologische Korrelation zwischen diastatischer Zuckerbildung und fermentativem Hexoseabbau ist durchbrochen; der Abbau des Traubenzuckers bleibt weit hinter der gesteigerten Produktion desselben unter dem Einfluß von Adrenalin zurück. Es kommt zur „Zuckerhochstauung". Schon *Wilenko*[1]) hat auf Grund der Beobachtung, daß Adrenalin nicht nur keine Steigerung des respiratorischen Quotienten im Tierversuch hervorruft — späterhin von *Bornstein*[2]) sowie *Abelin*[3]) bestätigt —, sondern sogar die physiologische Steigerung des respiratorischen Quotienten, die in der Norm nach Zufuhr von Kohlenhydraten auftritt, fast gänzlich unterdrückt, auf eine Herabsetzung der zuckerzerstörenden Prozesse unter der Einwirkung dieses Hormons geschlossen. *Loewi* und *Weselko*[4]) haben den hiermit in Einklang stehenden Befund erhoben, daß das Herz adrenalingespritzter Kaninchen aus zuckerhaltigen Lösungen erheblich weniger Dextrose aufnimmt und verarbeitet als das gleiche Organ normaler Tiere.

Umgekehrt liegen die Verhältnisse für das *Insulin*. *Neuberg*, *Gottschalk* und *Strauss*[5]) haben bereits früher den Einfluß von Insulin auf die Acetaldehydbildung in überlebenden Warmblüterzellen untersucht und festgestellt, daß in Gegenwart des Pankreasinkrets innerhalb 5 Stunden sowohl von Leber- wie von Muskelzellen 2½ mal soviel Aldehyd erzeugt wird wie in der hormonfreien Kontrolle. Durch diese Experimente war der erste direkte Beweis für den fördernden Einfluß des Insulins auf den oxydativen Kohlenhydratabbau in Leber und Muskulatur geliefert worden, ein Befund, der mit gleicher und

---

[1]) *G. G. Wilenko*, diese Zeitschr. **42**, 44, 1912; Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **71**, 261, 1913.

[2]) *A. Bornstein*, diese Zeitschr. **114**, 157, 1921; **126**, 64, 1921.

[3]) *J. Abelin*, ebendaselbst **129**, 1, 1922.

[4]) *O. Loewi* und *O. Weselko*, Arch. f. d. ges. Physiol. **158**, 155, 1914.

[5]) *C. Neuberg*, *A. Gottschalk* und *H. Strauss*, Deutsch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 45; *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **146**, 164, 1924.

anders gearteter Methodik späterhin wiederholt bestätigt worden ist[1]). Aber Insulin begünstigt nicht nur die oxydative Verarbeitung des in der Zelle intermediär entstehenden Zuckers, es fördert auch — wiederum im Gegensatz zu Adrenalin — die Verwertung *zugeführter* d-Glucose im tierischen Organismus. So hat schon *Clarke*[2]) beobachtet, daß aus glucosehaltiger Lockelösung nach Passage der Pankreasgefäße, die die Reduktionskraft unbeeinflußt läßt, bei einer nachfolgenden Herzdurchspülung mehr Zucker verschwindet als aus einer Lockelösung gleichen Zuckergehalts, die nicht mit dem Pankreas in Berührung gekommen war. *Ahlgren*[3]) hat mit Hilfe der *Thunberg*schen Methode gezeigt, daß Methylenblau in Gegenwart von Glucose und Gewebe pankreatomierter Tiere spontan nur langsam und spärlich reduziert wird, durch Beigabe von Insulin hingegen binnen kurzer Zeit in die Leukobase überzuführen ist. Fernerhin vermochten *Neuberg* und *Gottschalk* (l. c.) darzutun, daß die Acetaldehydproduktion in überlebenden Warmblüterzellen durch Zusatz von d-Glucose nicht gesteigert wird, durch gleichzeitigen Zusatz von Insulin und Traubenzucker jedoch eine Vermehrung um 38 Proz. erfährt. Hiermit in guter Übereinstimmung steht die von *Bissinger*, *Lesser* und *Zipf*[4]) als ersten gemachte Feststellung, daß Pankreasinkret die Verwertung parenteral beigebrachten Traubenzuckers durch Anfachung des gekoppelten Prozesses von Zuckerverbrennung und Glykogensynthese fördert.

Die gegensätzliche Wirkungsweise von Adrenalin und Insulin auf den Zuckerumsatz der Warmblüterzellen konnte auch durch den Kombinationsversuch erwiesen werden. Fügt man zu einer Leberzellensuspension gleichzeitig Adrenalin *und* Insulin hinzu, so ist die Aldehydausbeute eine Resultante zwischen dem jeweiligen Adrenalin- und Insulineffekt.

Beispiel: I. Ansatz: 48 g Leberbrei (Kaninchen) + 150 ccm körperwarmer, phosphatgepufferter Tyrodelösung ($p_H = 7,0$) + 3,0 g Calciumsulfit + 0,8 g Rivanol bei 40°.

II. Ansatz wie I., jedoch Zugabe von 1,0 ccm Insulin *Brand*.

---

[1]) Bezüglich der umfangreichen Insulinliteratur muß auf die ausgezeichneten Zusammenfassungen von *J. J. R. Macleod*, Insulin, Physiol. Rev. **6**, Nr. 1, Januar 1924; *H. Staub*, Insulin, Berlin 1924; *E. J. Lesser*, Die innere Sekretion des Pankreas, Jena 1924, verwiesen werden.

[2]) *A. H. Clarke*, Johns Hopkins Hosp. Rept. **18**, 229, 1917.

[3]) *G. Ahlgren*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 26.

[4]) *E. Bissinger*, *E. J. Lesser* und *K. Zipf*, Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 49; vgl. hierzu auch *Th. Brugsch*, Med. Klinik 1924, Nr. 1; *Th. Brugsch*, *A. Benatt*, *H. Horsters* und *R. Katz*, diese Zeitschr. **147**, 117, 1924; *J. A. Collazo*, *M. Händel* und *P. Rubino*, Deutsch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 23.

III. Ansatz wie I., jedoch Zugabe von 1,0 ccm Adrenalin Höchst + 1,0 ccm Insulin *Brand*.

Nach 24 Stunden Aufarbeitung und quantitative Aldehydbestimmung:

Kontrolle	4,09 mg	Acetaldehyd
Insulinversuch	11,75 „	„
Adrenalin-Insulinversuch . . .	8,22 „	„

I. Ansatz: 42 g Leberbrei (Kaninchen) + 125 ccm körperwarmer, phosphatgepufferter Tyrodelösung (p_H = 7,0) + 3,0 g Calciumsulfit + 0,8 g Rivanol bei 40°.

II. Ansatz wie I., jedoch Beigabe von 1,0 ccm Insulin *Brand*.

III. Ansatz wie I., jedoch Beigabe von 1,0 ccm Adrenalin Höchst + 1,0 ccm Insulin *Brand*.

Nach 24 Stunden Aufarbeitung und quantitative Aldehydbestimmung.

Kontrolle	4,48 mg	Acetaldehyd
Insulinversuch	13,01 „	„
Adrenalin-Insulinversuch . . .	7,79 „	„

Hinsichtlich dieser antagonistischen Wirkung von Adrenalin und Insulin sind *Macleod*[1]), *Bornstein*[2]), *Ahlgren*[3]), *Raab*[4]) auf Grund von Tierversuchen mit anderer Methodik (Bestimmung des Blutzuckers am Gesamttier, in der Durchspülungsflüssigkeit der überlebenden Leber, Methylenblauverfahren) unabhängig von uns[5]) zu dem gleichen Ergebnis gelangt. Vermutet hatten einen solchen Antagonismus bereits frühere Autoren [*Zuelzer*[6]), *Dresel* und *Peiper*[7]) u. a.]; jedoch haben diese Untersucher mit dem Extrakt der gesamten Bauchspeicheldrüse gearbeitet. Eine eindeutige Entscheidung ist erst nach Darstellung reiner Insulinpräparate durch die Torontoer Forscher möglich geworden.

Das Problem des Zustandekommens der Adrenalinhyperglykämie bzw. der Nichtverwertung zugeführten Traubenzuckers bei Adrenalinapplikation ist zwar durch den Nachweis des gestörten Zuckerabbaues eingeengt, aber nicht völlig gelöst. Ungeklärt bleibt, aus welchem Grunde die glykolytische bzw. oxydative Weiterverarbeitung des Hexosemoleküls ausbleibt. Ebenso ist nicht ersichtlich, worauf die im Vergleich zu normalen Verhältnissen sehr schnelle Umsetzung dargebotenen Zuckers bei gleichzeitiger Insulingabe zurückzuführen

---

1) *J. J. R. Macleod*, l. c.
2) *A. Bornstein*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 16.
3) *G. Ahlgren*, ebendaselbst 1924, Nr. 16.
4) *W. Raab*, ebendaselbst 1924, Nr. 37.
5) *A. Gottschalk*, ebendaselbst 1924, Nr. 30.
6) *G. Zuelzer*, Berlin. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 16.
7) *K. Dresel* u. *A. Peiper*, Zeitschr. f. exper. Path. u. Ther. **16**, 327, 1914.

ist. Neuere Untersuchungsergebnisse von *Macleod*, *Winter* und *Smith*, *Abelin* u. a. weisen darauf hin, daß unter dem Einfluß dieser Inkrete auch qualitative Änderungen am Zuckermolekül vor sich gehen.

Winter und *Smith*[1]) sowie *Nakahayashi* und *Abelin*[2]) haben angegeben, daß der Polarisationswert des Blutzuckers, der normalerweise geringer ist als der Reduktionswert (*Oppler*, *Stepp*, *Winter* und *Smith*, *Eadie*), nach Adrenalininjektion den Reduktionswert übersteigt. Insulin hingegen bewirkt nach den übereinstimmenden Befunden von *Macleod*[3]), *Winter* und *Smith*[4]) eine entgegengesetzte Änderung im optischen Verhalten des Blutzuckers von Diabetikern. Zwar ist mit Recht darauf aufmerksam gemacht worden, daß bei der Blutzuckeruntersuchung nach *Winter* und *Smith* zum Zwecke der Enteiweißung Eingriffe in die zu polarisierende Lösung vorgenommen werden, die an sich schon zu Drehungsänderungen des Zuckers Anlaß geben könnten. [Drehungsänderung durch Variation der Wasserstoffionenkonzentration[5]) infolge Säurezusatz und Eindampfung; etwaige Bildung von Wolframsäure-Zuckerverbindungen usw.] Auch haben *Macleod* und *Eadie*[6]) die Angabe von *Winter* und *Smith*[7]), daß die Dextrorotation einer Glucoselösung in Gegenwart von Insulin und Leberextrakt vermindert wird, nicht bestätigt. Wohl aber scheint sich zu bewahrheiten, daß es Fälle von Diabetes apancreaticus sowie experimentell zu erzeugende Zustände des Organismus gibt, die im Vergleich zur Norm bei Anwendung derselben chemischen Vorbehandlung der Blutflüssigkeit durch eine Änderung der optischen Eigenschaften des Blutzuckers charakterisiert sind. Über die zugrunde liegenden strukturchemischen Verhältnisse wissen wir nichts.

Auf Grund der obigen Ausführungen kann gesagt werden, daß Insulin und Adrenalin Inkrete darstellen, die hinsichtlich ihrer Wirkung auf den intermediären Kohlenhydratstoffwechsel Antagonisten sind. Während Insulin die Verwertung der stabilen d-Glucose ermöglicht bzw. begünstigt, geht der Einfluß des Adrenalins dahin, daß der mobilisierte bzw. von außen zugeführte Traubenzucker von dem Fermentapparat der Zelle nur schwer bzw. gar nicht angegriffen wird. Da heute die Ansicht ziemlich allgemein verbreitet ist, daß die maßgebenden Umwandlungen der 6-Kohlenstoffkette an einer besonders labilen und reaktionsfähigen Hexoseform vollzogen werden (*Neuberg*, *Laquer*, *Isaac*, *Gottschalk*, *Macleod*, *Krogh*, *Winter* und *Smith*, *Ahlgren*,

[1]) *L. B. Winter* und *W. Smith*, Brit. Med. Journ. vom 26. Mai 1923; Journ. of physiol. **57**, III, 1923.

[2]) *S. Nakahayashi* und *J. Abelin*, diese Zeitschr. **147**, 544, 1924.

[3]) *J. J. R. Macleod*, Lancet **205**, 198, 1923.

[4]) *L. B. Winter* und *W. Smith*, l. c.; *W. Forrest*, *W. Devereux*, *W. Smith* und *L. B. Winter*, Journ. of physiol. **57**, 224, 1923.

[5]) Vgl. hierzu *B. Bleyer* und *H. Schmidt*, diese Zeitschr. **138**, 119, 1923.

[6]) *J. J. R. Macleod*, Lancet **205**, 198, 1923; *G. S. Eadie*, Brit. med. Journ. Nr. 3263, S. 60, 1923.

[7]) *L. B. Winter* und *W. Smith*, Journ. of physiol. **57**, XIII, 1923.

Kuhn, Umber u. a.), erscheint uns die Annahme gerechtfertigt, daß Insulin und Adrenalin in der zuckerverarbeitenden Tierzelle die Bildung dieser labilen Glucosemodifikation[1]), die den eigentlichen Kohlenhydratumsatz einleitet und engste Beziehungen zur Phosphorsäure unterhält, in antagonistischer Weise regulieren. Es erübrigt sich, zu erwähnen, daß der Wirkungsbereich der beiden Hormone mit der Leistung der oben erörterten Regulation nicht erschöpft ist. Hinweise liegen vor, daß diese Inkrete auch in die chemichen Prozesse, die Zucker- und Fettstoffwechsel miteinander verbinden, eingreifen; jedoch mangelt es noch an eindeutigen experimentellen Teilergebnissen.

---

[1]) Vgl. hierzu *C. Neuberg, A. Gottschalk* und *H. Strauss*, l. c.

Zur Frage über die Assimilation des Paraffins durch Mikroorganismen.

Von

W. O. Tausson.

(Aus dem Timiriazew-Forschungsinstitut in Moskau.)

(Eingegangen am 8. Januar 1925.)

I. Einleitung.

Das Vermögen der Mikroorganismen, verschiedene Kohlenwasserstoffe, vor allem Paraffine, als alleinige Kohlenstoffquelle zu benutzen, ist bereits von einer ganzen Reihe von Autoren nachgewiesen worden. Einige Organismen, welche die genannten Stoffe assimilieren, sind schon früher von verschiedenen Gelehrten in reinen Kulturen herangezüchtet und erforscht worden.

Ein Verzeichnis der einschlägigen Literatur ist am Schluß des Aufsatzes angeführt.

Alle Autoren, mit Ausnahme von *Rhan*, benutzten Bakterien als Objekte ihrer Forschungen, doch infolge der Schwierigkeit, die Menge der Trockensubstanz zu bestimmen, konnte der Prozeß nicht mit der erforderlichen Genauigkeit verfolgt werden. Zur Erforschung der Physiologie des Oxydationsprozesses des Paraffins (wie auch der anderen Kohlenwasserstoffe) bietet der Schimmelpilz ein weit geeigneteres Objekt. Die Mengen der neu entstandenen Stoffe (Verbrennungsprodukte des Paraffins und die Zwischenprodukte) können in diesem Falle genau bestimmt werden.

Im Sommer 1913 arbeitete Prof. *E. E. Uspenski* mit Kohlen- und Wasserkulturen von Brennesseln (und Equisetum) in Paraffingefäßen. In einzelnen Fällen bildete sich an den Wänden der Gefäße ein Anflug von Schimmelpilzmycel und Bakterien (ersterer in Kohlenkulturen, letzterer in Wasserkulturen).

Das Pilzmycel verbreitete sich an der Oberfläche des Paraffins von etwa 2 bis 6 cm unterhalb des oberen Randes der Kohlenschicht bis zum Niveau der Flüssigkeit am Boden des Gefäßes, wo genügend

Feuchtigkeit vorhanden war und die Luft trotzdem freien Zutritt hatte. Der Bakterienanflug bildete sich an der unteren Fläche der Paraffinpfropfen. Prof. *E. E. Uspenski* stellte auf Agarbouillon eine Reinkultur dieses Pilzes her und bestimmte ihn als eine dem Aspergillus flavus sehr ähnliche Art.

Ende 1922 übergab er mir den Pilz und forderte mich auf, seine Entwicklung auf dem Paraffin und die Physiologie dieses Oxydierungsprozesses näher zu erforschen.

II. Eigene Untersuchungen.

1. Vorläufige Versuche und Methodik.

Da die Zersetzung des Paraffins ein Oxydierungsprozeß ist, so muß das Paraffin zwecks ausreichender Durchlüftung in feinzerteiltem Zustande in die Kulturen eingeführt werden. In ein Kolbenglas von etwa 200 bis 250 ccm Inhalt bringt man etwa 2 g Paraffin und 50 ccm destilliertes Wasser, wärmt das Kolbenglas so lange, bis das Paraffin schmilzt, schüttelt den Inhalt des Gefäßes tüchtig durcheinander und gießt die auf solche Art hergestellte Emulsion des in heißem Wasser geschmolzenen Paraffins in 50 ccm kalter Mineralnährlösung von doppelter (im Vergleich zu der gewöhnlich gebräuchlichen) Konzentration. In der kalten Lösung erstarrt das Paraffin in Form kleiner Körnchen, welche an der Oberfläche schwimmen und eine zusammenhängende Schicht fein zerteilten Paraffins bilden. Um die Lösung mit dem darin befindlichen Paraffin steril zu erhalten, soll man erstere getrennt sterilisieren und das im Wasser enthaltene Paraffin im Autoklaven schmelzen. Die Impfung der auf diese Art vorbereiteten Lösung mit Sporen des Aspergillus gab schon vom erstenmal positive Resultate. In allen Fällen trat eine üppige Entwicklung des die Paraffinkörnchen umhüllenden Mycels ein.

Ein solches Verfahren hat aber große Mängel. Da beim Umgießen der heißen Emulsion dieselbe zum Teil an den Wänden des Glases erstarrt und das Entwässern des erstarrten Paraffins in einem solchen Falle sehr schwer ist, so ist eine Bestimmung der Menge des in die Kultur eingeführten Paraffins mit großen Schwierigkeiten verbunden und eine genaue quantitative Bestimmung derselben unmöglich.

Wenn man aber die Emulsion im Kulturkolben selbst herstellt und dann das Glas von außen mit kaltem Wasser abkühlt, so erstarrt ein Teil des Paraffins in einer zusammenhängenden dünnen Schicht an den Wänden des Glases. Dadurch wird sowohl das Ausnutzen des Paraffins seitens des Pilzes zum Ende des Versuchs erschwert, als auch das Beobachten der Entwicklung des Pilzes verhindert.

In Anbetracht dieser Schwierigkeiten wandte ich eine andere Methode an, der ich mich auch bei allen weiteren Versuchen, sowohl qualitativer als auch quantitativer Art bediente. Mein Verfahren bestand in folgendem: in ein Kolbenglas von etwa 60 bis 100 ccm Inhalt brachte ich 10 bis 12 g Paraffin, stülpte eine wattierte baumwollene Kappe darüber und steckte ein meißelförmig angespitztes Glasstäbchen von oben durch die Kappe in das Gefäß. Um das Entstehen offener, mit der Außenluft in Verbindung stehender Zwischen-

räume zu vermeiden, bindet man die Kappe über dem Kolbenglase und am Halse desselben fest ab. Das so vorbereitete Kolbenglas wird auf gewöhnliche Art bei einer entsprechenden Temperatur im Autoklaven sterilisiert. Sobald das Paraffin abgekühlt und erstarrt ist, schabt man mit Hilfe des Glasstäbchens, ohne die Kappe abzunehmen, das nötige Quantum Paraffinspänchen ab und schüttet es in das Kulturglas, wobei natürlich die Regeln des sterilen Verfahrens streng innegehalten werden müssen. Die Differenz im Gewicht des Kolbenglases mit Kappe und Glasstäbchen vor und nach der Entnahme der Paraffinspänchen gibt die Gewichtsmenge des erfaßten Paraffins an. Die Menge des verbrauchten Paraffins ergibt sich aus der Differenz zwischen dem Gewicht des ursprünglich genommenen und dem des unausgenutzt gebliebenen Paraffins. Letzteres wird nach Beendigung des Versuchs zusammen mit dem Mycel (von dem es auf mechanischem Wege nicht geschieden werden kann) auf ein Filter gebracht, abgewaschen, getrocknet und im *Soxhlet*schen Apparat mit gewöhnlichem Äther extrahiert. Nach Entfernung des Äthers aus dem Extrakt wird die Menge des unausgenutzten Paraffins durch Abwägen bestimmt.

Allerdings haben wir es bei einem solchen Verfahren nicht mit absolut reinem Paraffin zu tun, sondern mit einer Mischung des letzteren mit Zwischenprodukten. Wie jedoch der Versuch zeigt, ist die Menge dieser Zwischenprodukte sehr unbedeutend und die hieraus entspringende Ungenauigkeit darf unberücksichtigt bleiben.

Der Pilz wurde bei 23 bis 25° C im Thermostaten kultiviert. Als Mineral-Nährlösung benutzte ich *Knop*sche Lösung folgender Zusammensetzung:

$Ca(NO_3)_2$	0,1 g
KNO_3	0,025 g
KH_2PO_4	0,025 g
$MgSO_4$	0,025 g
$Fe_2(SO_4)_3$	0,0025 g
Aqua dest.	100 ccm

Was das Paraffin anbetrifft, so benutzte ich bei meinen Versuchen meist ein solches von hohem Schmelzpunkte (+ 78° C)[1].

Die erste Versuchsreihe sollte dazu dienen, das Wachstum des Pilzes auf Paraffin als alleiniger Kohlenstoffquelle zu beobachten. Es wurden benutzt: Paraffin mit Schmelzpunkt 78° C, Paraffin mit Schmelzpunkt 52° C, ferner weißes amerikanisches Vaselin. In ein „*Winogradski*-Kolbenglas" mit 100 ccm sterilisierter Minerallösung von der oben angeführten Zusammensetzung wurden 3 bis 5 g der auf die beschriebene Art hergestellten Paraffinspänchen gebracht. Das Vaselin

[1]) *Merck*, Darmstadt.

wurde unmittelbar auf die Oberfläche der Minerallösung gegossen, so daß es eine nur dünne Schicht bildete:

Nr. 1	2,50 g	Paraffin, Schmelzpunkt 78° C,
Nr. 2	3,80 g	
Nr. 3	5,00 g	Paraffin, Schmelzpunkt 52° C,
Nr. 4	4,08 g	
Nr. 5	3,95 g	weißes amerikanisches Vaselin.
Nr. 6	4,70 g	

In Kulturen auf Paraffin ist die Entwicklung des Mycels bereits nach 10 Tagen zu bemerken. Die Flüssigkeit ist farblos.

Innerhalb 13 Tagen ist die Entwicklung des Mycels bedeutend fortgeschritten. Die Hyphen umhüllen jedes einzelne Stückchen Paraffin, dringen jedoch noch nicht in das Innere derselben ein. Das Mycel ist von außen gelblich, die Lösung ist blaßgelb gefärbt.

Nach 18 Tagen bedeckt das Mycel die Parraffinspänchen in zusammenhängender Schicht. Die einzelnen Paraffinstückchen sind nur von unten sichtbar. Es findet Sporenbildung statt. Die Lösung ist rötlich gelb gefärbt.

Nach 22 Tagen massenhafte Sporenbildung. Die Flüssigkeit ist braunrot gefärbt (wie kräftig aufgebrühter Tee).

Nach 5 Wochen ist der Versuch beendet. Ein Unterschied im Wachstum auf den verschiedenen Paraffinsorten (78 und 52° C) war nicht zu beobachten.

In Kulturen auf Vaselin ist nach 10 Tagen die Entwicklung des Mycels nur an solchen Stellen zu beobachten, wo die Vaselinschicht gerissen ist. Auf unverletzten Flächen der Vaselinschicht findet eine Entwicklung des Mycels nicht statt. In der Folge lokalisiert sich die Entwicklung des Pilzes ausschließlich an Stellen, wo der Zusammenhang der Vaselinschicht unterbrochen ist, an solchen Stellen ist sein Wachstum ein recht üppiges. Die Flüssigkeit ist gelblich rot gefärbt.

Mikroskopische Beobachtungen der Entwicklung des Pilzes auf Paraffin in einem feuchten Raume lehrten, daß die Entwicklung des Mycels und das Eindringen seiner Hyphen in das Paraffin anfangs nur an der Oberfläche stattfindet und erst in der Folge von der Peripherie allmählich immer tiefere Schichten angreift.

Die Versuche bestätigen die bereits früher gemachte Annahme, daß bei dem Assimilationsprozeß des Paraffins eine möglichst unbeschränkte Sauerstoffzufuhr aus der Luft unbedingt notwendig sei. Wo eine solche Zufuhr unmöglich ist (ganze, zusammenhängende Partien der Vaselinschicht), wurde eine Entwicklung des Pilzes nicht beobachtet.

Es ist bemerkenswert, daß zu Beginn des Versuchs die Entwicklung des Mycels sehr langsam vor sich geht. Es fragte sich, ob dieser Umstand

nicht etwa mit einer ungeeigneten Beschaffenheit der Lösung (ihrer Reaktion) im Zusammenhang stehe. Um diese Frage zu lösen, führte ich eine Reihe von Versuchen aus, in denen die Reaktion der Lösung unter sonst gleichen Bedingungen von $p_H = 4,7$ bis $p_H = 8,1$ verändert wurde. Die Minerallösung blieb dieselbe wie in der vorhergehenden Serie, es wurde nur die relative Menge von KH_2PO_4 und K_2HPO_4 geändert, um ein bestimmtes p_H zu erzielen. Als Kulturgefäße wurden runde Kolben von 100 ccm Inhalt benutzt. Das Paraffin (Schmelzpunkt 78°) wurde in einer Menge von 0,4 bis 0,5 g gewonnen.

Tabelle I.

Nr.	Reaktion der Lösung p_H		Nr.	Reaktion der Lösung p_H	
	im Anfang	am Ende		im Anfang	am Ende
1	4,8	7,3	14	6,4	7,5
2	4,7	7,2	15	7,0	7,6
3	5,2	7,3	16	7,0	7,7
4	5,2	7,3	17	7,2	7,6
5	5,5	7,3	18	7,2	7,8
6	5,2	7,4	19	7,4	7,6
7	5,65	7,3	20	7,4	7,6
8	5,5	7,3	21	7,6	7,6
9	5,5	7,4	22	7,6	7 7
10	5,65	7,5	23	7,7	7,8
11	5,8	7,7	24	7,6	7,7
12	5,95	7,6	25	8,1	8,1
13	6,4	7,6	26	8,0	8,0

Nach 7 Tagen ist das Wachstum in den Lösungen mit $p_H = 4,7$ bis 6,4 nur schwach, es wird jedoch stärker, sobald man das p_H auf 7,7 erhöht. Bei $p_H = 8,1$ ist das Wachstum etwas schwächer.

Nach 11 Tagen ist der Charakter des Wachstums derselbe. Es wird die Bildung eines Pigments beobachtet. Die Färbung ändert sich bei p_H = etwa 6,0, sie ist in alkalischer Lösung rötlich, in saurer gelblich.

Nach 15 Tagen tritt eine starke Pigmentierung ein.

Die Färbung ist in alkalischer Lösung rot, in saurer gelb. Die Unterschiede im Wachstum fangen an, sich auszugleichen.

Nach 3 Wochen ist ein Unterschied im Wachstum kaum noch festzustellen. Auch in der Färbung der Lösung ist kein auffallender Unterschied mehr vorhanden.

Nach 4 Wochen gleichen sich die Kulturen vollkommen aus. Die p_H-Proben (nach 5 Wochen) ergaben, daß sich in allen Fällen das p_H im Sinne einer größeren Alkalität bis auf 7,2 bis 7,8 geändert hatte. Das Wachstum wird demnach durch eine saure Reaktion der Lösung gehemmt, dagegen gleicht sich der Unterschied im Wachstum bei einer allmählichen Alkalisierung der Lösung aus.

2. Hauptversuche.

a) Einfluß des Stickstoffs und Sauerstoffs der Lösung.

Um das Verhalten unseres Aspergillus gegenüber der Stickstoffnahrung und der Reaktion der Lösung zu untersuchen, sowie zur Bestimmung des ökonomischen Koeffizienten und der Oxydierungsenergie des Paraffins führte ich eine Reihe von Versuchen nach folgendem Schema aus:

Kohlenstoffquelle — Paraffin, Schmelzpunkt 78° C.

Minerallösung — die bereits erwähnte *Knop*sche Lösung, welche in bezug auf die zu benutzende Stickstoffquelle wie folgt variiert wurde:

Stickstoffquelle: 1. Nitrate [$Ca(NO_3)_2$ und KNO_3].
2. Ammoniumsalze — schwefelsaures Ammonium, salpetersaures Ammonium.

Letzteres wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen genommen:

1. Berechnet auf die Gesamtmenge des Stickstoffs und

2. Berechnet nur auf den Ammoniumstickstoff, so daß in diesem Falle die Menge des Ammoniumstickstoffs doppelt so groß war. Für jede Lösung wurden vier Gefäße benutzt, von denen in je zwei Calciumcarbonat hinzugefügt wurde, um die Säuren, welche sich möglicherweise bilden könnten, zu neutralisieren und eine konstante Reaktion der Lösung zu erhalten (das Calciumcarbonat wurde für sich allein sterilisiert).

Die Ammoniumsalze wurden getrennt sterilisiert, um einen möglichen Zerfall oder Veränderung derselben zu verhüten.

Der Pilz wurde in „*Winogradski*-Kolbengläsern" bei 23 bis 25° während 6 Wochen kultiviert.

Minerallösungen:

Lösung I, Nr. 1, 2, 3 und 4:		Lösung II, Nr. 5, 6, 7 und 8:	
$Ca(NO_3)_2$	0,1 g	$(NH_4)_2SO_4$ . . .	0,1 g
KNO_3	0,025 g	$MgSO_4$	0,025 g
$MgSO_4$	0,025 g	KH_2PO_4	0,05 g
KH_2PO_4	0,025 g	$CaSO_4$	0,75 g
$Fe_2(SO_4)_3$	0,0025 g	$Fe_2(SO_4)_3$ . . .	0,0025 g
Aqua dest. . . .	100,00 ccm	Aqua dest. . . .	100,00 ccm

Lösung III, Nr. 9, 10, 11 und 12:		Lösung IV, Nr. 13, 14, 15 und 16:	
NH_4NO_3	0,05 g	NH_4NO_3	0,1 g
$MgSO_4$	0,025 g	$MgSO_4$	0,025 g
KH_2PO_4	0,05 g	KH_2PO_4	0,05 g
$CaSO_4$	0,075 g	$CaSO_4$	0,075 g
$Fe_2(SO_4)_3$	0,0025 g	$Fe_2(SO_4)_3$ . . .	0,0025 g
Aqua dest. . . .	100,00 ccm	Aqua dest. . . .	100,00 ccm

In Nr. 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 und 16 wurde je 1 g Calciumcarbonat hinzugefügt.

Tabelle II.

Nr.	Stickstoffquelle	Mengen des Paraffins: gefaßt mg	Mengen des Paraffins: zurück bleiben mg	Paraffin verbrannt: mg	Paraffin verbrannt: Proz.	Gewicht des Myceliums mg	Gewicht der Asche mg	Entstanden organische Stoffe mg	Ökonomischer Koeffizient	Entstanden organische Stoffe auf 1 g Paraffin mg	Reaktion d. Lösung p_H: im Anfang	Reaktion d. Lösung p_H: am Ende	Bemerkungen
1	NO_3'	1129,6	390,8	738,8	65,4	477,2	35,6	441,6	59,7	390,9	5,8	7,3	ohne $CaCO_3$
2	NO_3'	1469,4	667,5	801,9	54,5	484,5	32,8	451,7	56,3	307,4	5,8	7,3	ohne $CaCO_3$
3	NO_3'	1248,8	426,2	822,6	65,8	507,8	9,6	498,2	60,5	398,9	7,9	7,9	mit $CaCO_3$
4	NO_3'	1217,2	443,2	774,0	63,5	477,8	10,7	467,1	60,3	383,8	7,9	7,9	mit $CaCO_3$
5	$(NH_4)_2SO_4$	905,0	672,7	232,3	25,6	132,3	3,6	128,7	55,4	142,2	5,8	3,0	ohne $CaCO_3$
6	$(NH_4)_2SO_4$	932,6	640,2	292,4	31,3	187,8	5,4	182,4	62,3	195,6	5,9	3,0	ohne $CaCO_3$
7	$(NH_4)_2SO_4$	1208,2	390,8	817,4	67,6	536,2	12,6	523,6	65,6	433,4	7,9	7,6	mit $CaCO_3$
8	$(NH_4)_2SO_4$	1723,6	760,4	963,2	55,8	614,6	12,2	602,4	63,7	349,4	7,9	7,6	mit $CaCO_3$
9	$NH_4 . NO_3$	1427,8	539,8	888,0	62,1	352,2	6,4	345,8	38,9	242,1	5,8	4,2	ohne $CaCO_3$
10	$NH_4 . NO_3$	1484,6	668,0	816,6	55,0	309,0	8,0	301,0	37,2	202,7	5,8	4,2	ohne $CaCO_3$
11	$NH_4 . NO_3$	1214,5	298,8	915,7	75,3	567,2	11,6	555,6	60,6	457,5	7,9	7,9	mit $CaCO_3$
12	$NH_4 . NO_3$	1141,5	341,2	800,3	70,1	527,8	10,4	517,4	64,6	464,2	7,9	7,9	mit $CaCO_3$
13	$NH_4 . NO_3$	1196,0	495,4	700,6	58,5	265,6	5,4	260,2	37,1	217,7	5,8	4,2	ohne $CaCO_3$
14	$NH_4 . NO_3$	1262,2	586,8	675,4	53,5	247,2	6,4	240,8	35,3	190,7	5,8	4,2	ohne $CaCO_3$
15	$NH_4 . NO_3$	1566,4	508,4	1058,0	67,2	715,6	13,6	702,0	66,3	448,1	7,9	7,9	mit $CaCO_3$
16	$NH_4 . NO_3$	1561,0	517,0	1044,0	66,8	568,0	14,4	553,6	53,0	354,7	7,9	7,9	mit $CaCO_3$

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe berechtigen zu folgenden Schlüssen:

1. Unser Aspergillus kann sowohl Nitrat- als auch Ammoniumstickstoff gleich gut ausnutzen (Nr. 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 und 16, II). In allen Kulturen mit $CaCO_3$ beträgt p_H am Ende des Versuchs 7,6 bis 7,9. Zu Beginn des Versuchs ist $p_H = 7{,}9$. Eine geringe Abnahme des p_H in Nr. 7 und 8 ist wahrscheinlich durch die schwere Lösbarkeit des sich bildenden Gipses verursacht.

2. Im Falle einer möglichen Wahl zwischen Ammonium- und Nitratstickstoff zieht der Pilz ersteren vor (Nr. 9, 10, 11 und 12), indem er den Ammoniumstickstoff benutzt, den Nitratstickstoff aber überhaupt nicht oder nur teilweise in Angriff nimmt. Dieser Umstand zieht eine stark ausgesprochene Ansäuerung der Lösung nach sich (bis $p_H = 4{,}2$). Immerhin ist diese Ansäuerung geringer als im Falle von $(NH_4)_2SO_4$, wo p_H bis auf 3 herabgeht.

3. Wenn keine physiologisch sauren Salze vorhanden sind, findet Alkalisierung der Lösung statt (Nr. 1 und 2 mit $p_H = 5{,}8$ bis $p_H = 7{,}3$).

4. Eine saure Lösung hemmt beträchtlich die Entwicklung des Pilzes (Nr. 5, 6, 9, 10, 13 und 14).

5. Wenn die Ansäuerung durch freie Salpetersäure erfolgt, tritt eine starke Abnahme des ökonomischen Koeffizienten ein (von 53,0 bis 66,3 Proz. in Nr. 15 und 16, bis 35,3 bis 37,1 Proz. in Nr. 13 und 14).

6. Der ökonomische Koeffizient der Ausnutzung des Paraffins ist ein hoher und schwankt zwischen 53,0 und 66,3 Proz.

Die Pigmentbildung ist nicht in allen Kulturen die gleiche. In alkalischen Lösungen oder in solchen, die im Verlauf des Versuchs alkalisch werden, ist sie reichlicher, die Färbung des Pigments ist braunrot. In sauren Lösungen bildet sich das Pigment weit schwerer, die Farbe des Pigments ist gelb mit einem bräunlichen Ton. Wird der Pilz in einer Lösung kultiviert, welche nur Nitrate enthält, so ist ihre Färbung eine intensiv dunkelbraunrote; in Lösungen mit Ammoniumsalzen dagegen ist sie weniger intensiv und heller, was besonders deutlich zu sehen ist, wenn man Nr. 1, 2, 3 und 4 mit Nr. 5, 6, 7 und 8 [mit $(NH_4)_2SO_4$] vergleicht. Kulturen mit $(NH_4)_2SO_4$ nahmen sowohl in bezug auf Intensität als auch auf die Färbung eine Zwischenstellung ein.

Die größeren Aschenmengen in Nr. 1 und 2 sind durch ungenügend ausgewaschene Phosphate verursacht.

b) Zwischenprodukte.

Die Entwicklung des Pilzes auf Paraffin und der mit dem Wachstum des Pilzes verbundene Oxydierungsprozeß wird von einer sichtbaren Veränderung der vom Mycel umsponnenen Paraffinstückchen begleitet. Das Paraffin färbt sich gelb, wird morsch und benetzbar. Diese Veränderungen machen es wahrscheinlich, daß im Verlauf der Oxydierung des Paraffins eine Ansammlung von Zwischenprodukten stattfindet. Die Mengen dieses gelben Produkts sind sehr gering, und da aus technischen Gründen eine quantitative Bestimmung unmöglich war, mußte ich mich mit qualitativen Versuchen begnügen.

Um möglichst große Mengen dieses Zwischenproduktes zu erhalten, stellte ich Massenkulturen in bedeutend geräumigeren Gefäßen und mit größeren Stoffmengen her.

Die Versuche wurden in großen flachen Kolbengläsern mit 200 ccm Minerallösung ausgeführt und dauerten 12 Wochen.

Kohlenstoffquelle — Paraffin, Schmelzpunkt 78°.

Mineralnährlösung: in Nr. 17 und 18, Lösung I (siehe Serie II),
in Nr. 19 und 20, Lösung II (siehe Serie II).

Die Stickstoffquelle bildete in Nr. 17 und 18 Nitrate, in Nr. 19 und 20 schwefelsaures Ammonium. Außerdem wurden in Nr. 17 und 18 je 4,00 g, in Nr. 19 und 20 je 5,00 g Calciumcarbonat hinzugefügt.

Die Resultate stimmen im allgemeinen mit denen der vorhergehenden Serie überein und sind in nachstehender Tabelle III angeführt.

Die Alkalisierung der Nitrate enthaltenen Lösungen weist auf die Unmöglichkeit einer Ansammlung von freien Fettsäuren als Zwischenprodukte hin. Aus einer Mischung von unausgenutzt gebliebenem

Tabelle III.

Nr.	Stickstoffquelle	Mengen des Paraffins gefaßt mg	Mengen des Paraffins zurück bleiben mg	Paraffin verbrannt mg	Paraffin verbrannt Proz.	Gewicht des Myceliums mg	Gewicht der Asche mg	Entstanden organische Stoffe mg	Ökonomischer Koeffizient	Entstanden organische Stoffe auf 1 g Paraffin mg	Reaktion d. Lösung p_H im Anfang	Reaktion d. Lösung p_H am Ende
17	NO_3'	3649,0	1293,4	2355,4	64,5	1239,4	20,6	1218,8	51,7	334,0	7,9	7,8
18	NO_3'	3743,2	1340,8	2402,4	64,1	1338,4	55,8	1282,6	53,3	342,6	7,9	7,9
19	$(NH_4)_2SO_4$	4018,8	1808,4	2210,4	55,0	1228,2	59,8	1168,4	52,8	290,7	7,9	7,9
20	$(NH_4)_2SO_4$	3735,4	1937,6	1797,8	48,1	952,4	22,0	930,4	51,7	249,1	7,9	7,9

Paraffin und den Zwischenprodukten (von intensiv gelber Färbung) werden letztere durch wässerigen Alkohol (70⁰) aufgelöst, so wurden aus 1,2866 g einer Mischung von Paraffin und Zwischenprodukten 0,2340 g durch 70 proz. Alkohol ausgeschieden (festgestellt durch Gewichtsdifferenz). Die gewonnene Lösung hatte eine intensiv orangegelbe Färbung, durch Titration dieser Lösung konnten keine freien Fettsäuren nachgewiesen werden.

Bei Verseifung derselben Mischung von Paraffin und Zwischenprodukten durch Alkalien (Wasser- sowie Alkohollösungen) entsteht ebenfalls eine Gewichtsdifferenz. Zersetzt man die durch Verseifung gewonnene Alkohollösung mit verdünnter Schwefelsäure, so findet ein Ausscheiden von Fettsäuren statt; so verloren z. B. 1,0286 g der Mischung von Paraffin und Zwischenprodukten bei einer Verseifung durch 1 Proz. wässeriger KOH-Lösung 0,0230 g an Gewicht. Von freien Fettsäuren wurden 0,0178 g ausgeschieden.

Während der Verseifung weist die Alkalilösung einen starken Geruch auf, welcher anfangs an den künstlichen Syringengeruch erinnert (Terpineol). Der Charakter des Geruchs ändert sich jedoch allmählich, indem er durch eine Reihe verschiedener Abstufungen hindurchgeht.

Auf Grund der oben angeführten Beobachtungen darf man wohl annehmen, daß wir es mit Estern zu tun haben. Die Zwischenprodukte bilden wahrscheinlich eine mannigfaltige Mischung verschiedener Ester (oder vielmehr Ester und höherer Alkohole).

Ob die gelbe Masse tatsächlich ein Zwischenprodukt darstellt oder ob es nur ein Nebenprodukt ist, werden weitere Versuche zu entscheiden haben.

c) Das Verhalten gegenüber anderen Kohlenstoffquellen.

Um das Verhalten unseres Pilzes gegenüber anderen Kohlenstoffquellen zu untersuchen und die Energie des Wachstums auf Paraffin mit einer solchen auf anderen Kohlenstoffquellen zu vergleichen, führte ich eine Reihe von Versuchen nach folgendem Schema aus:

Serie IV. Mineralnährlösung I (s. Serie II).
Stickstoffquelle: Nitrate $Ca(NO_3)_2$ und KNO_3.
Kohlenstoffquellen:

In Nr. 1, 2, 3 und 4 . . . Paraffin, Schmelzpunkt 78°,
„ „ 5 und 6 . . . . . Kartoffelstärke,
„ „ 7 „ 8 . . . . . Saccharose (käufliche, auf das Fehlen von invertiertem Zucker geprüfte Raffinade),
„ „ 9 „ 10 . . . . . Maltose,
„ „ 11 „ 12 . . . . . Dextrose,
„ „ 13 „ 14 . . . . . Mannit,
„ „ 15 „ 16 . . . . . Glycerin,
„ „ 17 „ 18 . . . . . Pepton.

Alle benutzten Stoffe, mit Ausnahme der Saccharose, wurden von *Merck*, Darmstadt, bezogen.

Der Pilz wurde bei 23 bis 25° in „*Winogradski*-Kolbengläsern" während 6 Wochen kultiviert. Die Menge der benutzten Minerallösung betrug 100 ccm.

Die Resultate sind aus Tabelle IV zu ersehen.

Tabelle IV.

Nr.	Kohlenstoffquelle	Mengen der Nährstoffe		Nährstoffe verbrannt		Gewicht des Myceliums	Gewicht der Asche	Entstanden organische Stoffe	Ökonomischer Koeffizient	Entstanden Mycelium auf 1 g Nährstoffe	Reaktion d. Lösung p_H	
		gefaßt mg	zurück bleiben mg	mg	Proz.	mg	mg	mg		mg	im Anfang	am Ende
1	Paraffin .	2221,4	967,0	1254,4	56,0	821,8	27,6	794,2	63,3	370,0	6,4	7,4
2	„ .	2306,4	981,4	1325,0	57,1	844,0	27,4	816,6	61,6	365,9	6,4	7,4
3	„ .	2210,0	1053,0	1157,0	50,4	677,5	—	—	59,4	306,6	5,8	7,4
4	„ .	2172,6	1003,0	1169,6	53,8	626,2	—	—	53,5	288,2	5,8	7,4
5	Stärke . .	1980,0	—	—	—	568,0	—	—	—	286,8	6,4	7,8
6	„ . .	2000,0	—	—	—	551,8	—	—	—	275,9	—	7,8
7	Saccharose	1960,0	—	—	—	223,0	—	—	—	113,8	6,4	7,8
8	„	2000,0	—	—	—	275,0	—	—	—	137,5	—	7,8
9	Maltose . .	1980,0	45,0	1935,0	—	548,6	36,3	512,3	26,5	277,1	6,4	8,0
10	„ . .	2000,0	42,0	1958,0	—	594,6	41,4	553,2	28,2	297,3	—	8,0
11	Dextrose .	1980,0	20,0	1960,0	—	583,2	35,9	547,9	27,9	294,8	6,4	8,0
12	„ .	2000,0	0,0	2000,0	—	581,2	33,2	547,8	27,4	290,5	—	8,1
13	Mannit . .	1980,0	—	—	—	525,8	—	—	—	265,6	6,4	7,9
14	„ . .	2000,0	—	—	—	519,4	—	—	—	259,7	—	7,9
15	Glycerin .	1980,0	—	—	—	470,1	—	—	—	237,4	7,3	7,9
16	„ .	2000,0	—	—	—	495,8	—	—	—	247,9	—	7,9
17	Pepton . .	2000,0	—	—	—	410,4	—	—	—	205,2	—	8,8
18	„ . .	1980,0	—	—	—	353,7	—	—	—	178,6	6,4	8,8

Auf Grund dieser Versuchsreihe gelangen wir zu folgenden Ergebnissen:

1. Unser Aspergillus nutzt Stärke, Maltose, Dextrose und Mannit gut aus, weniger gut Glycerin und Pepton (die verhältnismäßig geringe

Ausnutzung des Peptons ist, wenigstens zum Teil, einer zu starken Alkalisierung der Lösung bis $p_H = 8{,}8$ zuzuschreiben). Bedeutend schlechter wird Saccharose assimiliert. Das Wachstum auf Stärke und Saccharose steht anfangs der Entwicklung des Pilzes auf anderen Nährstoffen nach, erst nach 3 Wochen bei Stärke und 4 Wochen bei Saccharose ist eine Beschleunigung des Wachstums zu beobachten. Auf Pepton geht die Entwicklung des Pilzes gleich zu Beginn insel- oder fleckenartig vor sich und behält diesen Charakter bis zum Ende des Versuchs.

2. In allen Fällen wurde eine merkbare Alkalisierung der Lösung beobachtet (von $p_H = 6{,}4$ bis $p_H = 7{,}8$ bis 8,1, ja sogar bis $p_H = 8{,}8$ im Falle des Peptons als Nährstoff), so daß eine Ausscheidung von Säuren ganz ausgeschlossen ist.

3. Der ökonomische Koeffizient, welcher für Maltose und Dextrose 28,2 Proz. nicht überschreitet, erreicht für Paraffin 63,5 Proz. Wenn man aber den Koeffizienten auf Grund der verbrauchten Energie berechnet[1]), ist ein derartiger Unterschied nicht zu beobachten, was darauf hinweist, daß der Unterschied zwischen den ökonomischen Koeffizienten von dem Energiegehalt der Stoffe abhängt.

Der Schimmelpilz entwickelt sich auch in anderen Nährlösungen durchaus gut. Er wächst gut auf dem gewöhnlichen alkalischen Bouillonagar mit 1 Proz. Glykose, etwas weniger gut auf Fleisch-Peptonagar mit 1 Proz. Glykose sowie in der *Raulin*schen Lösung.

3. Andere paraffinoxydierende Organismen.

Außer dem bereits beschriebenen Aspergillus habe ich noch einige andere paraffinoxydierende Organismen in Reinkulturen gezüchtet: noch eine Art Aspergillus, ein Penicillium, eine Art aus der Gruppe der fungi imperfecti und zwei Arten von Bakterien (kurze Stäbchen und etwas längere Stäbchen).

Diese Mikroorganismen habe ich aus Anflügen auf paraffinierten Pfropfen erhalten; die Pfropfen wurden für die Gläser der Wasserkulturen höherer Pflanzen benutzt, die ich im Pflanzenhäuschen des Polytechnischen Museums in Moskau im Sommer 1923 züchtete. Der an der unteren Fläche der Pfropfen befindliche Anflug wurde in ein Kolbenglas mit der bereits erwähnten Mineralnährlösung gebracht und als Kohlenstoffquelle wurden Paraffinspänchen hinzugegeben. Aus den auf diese Weise entstandenen Rohkulturen wurden auf übliche Art auf Fleisch-Peptonagar reine Kulturen hergestellt. Nach der Aussaat aller dieser Mikroorganismen auf Mineralnährlösung mit Paraffin als einziger Kohlenstoffquelle trat in allen Fällen die Entwicklung der

[1]) Vgl. *O. Flieg*, Jahrb. f. wissensch. Bot. **61**, 24, 1922.

betreffenden Mikroorganismen ein, wobei auch die charakteristische sichtbare Veränderung der Paraffinspänchen beobachtet wurde. Bei dem Schimmelpilz war das Bild demjenigen durchaus ähnlich, welches wir bei der Entwicklung unserer Aspergillus gesehen hatten. Ein Unterschied bestand nur darin, daß das Gelbwerden des Paraffins entweder überhaupt nicht eintrat oder doch nur sehr schwach ausgeprägt war. Bei der Entwicklung von Bakterien auf Paraffin wurde letzteres trübe, vollständig undurchsichtig und benetzbar; es schwamm nicht mehr an der Oberfläche der Lösung, sondern unterhalb derselben. Die beim Aspergillus so starke Pigmentierung ist bei Penicillium und einer Art der Bakterien (kurze Stäbchen) überaus schwach. Bei den erwähnten fungi imperfecti und bei der anderen Bakterienart ist eine Pigmentation überhaupt nicht beobachtet worden. Die Farbe des Pigments ist beim Aspergillus hellrosa bis gelblich, bei Penicillium ist sie schwach gelblichgrün und bei den kurzen Stäbchen hell blaugrün.

Bei der Kultivierung der genannten Organismen wurden gleichzeitig mehrere Paraffin enthaltende Gefäße geimpft, in denen die Reaktion der Lösung eine verschiedene war ($p_H = 5{,}2$ und $p_H = 7{,}0$). In allen Fällen trat die Entwicklung in den Gläsern mit $p_H = 7{,}0$ früher ein als in Gefäßen mit $p_H = 5{,}2$. Eine spätere Probe (nach 5 Wochen) zeigte, daß in allen Fällen eine merkbare Alkalisierung stattgefunden hatte (bis $p_H = 7{,}3$ bis 7,6). Dieser Umstand deutet auf eine physiologische Ähnlichkeit der genannten Mikroorganismen mit unserem Aspergillus hin.

Näher wurden diese Organismen bisher noch nicht untersucht.

III. Schlußfolgerungen.

Die beschriebenen Untersuchungen führen zu folgenden Ergebnissen:

1. Der Schimmelpilz, eine dem Aspergillus flavus ähnliche Art, nutzt Paraffin als Kohlenstoffquelle gut aus, indem er 75 Proz. des ins Kulturglas eingeführten Paraffins zersetzt.

2. Außer auf Paraffin entwickelt sich dieser Pilz auch auf Bouillonagar, nutzt Stärke, Maltose, Dextrose und Mannit gut aus, weniger gut Glycerin und Pepton und bedeutend schlechter Saccharose.

3. Als Stickstoffquelle sind sowohl Nitrate als auch Ammoniumsalze gleich gut geeignet, doch zieht der Pilz, wenn ihm die Möglichkeit einer Wahl gegeben ist, Ammoniumsalze vor.

4. Das Ansäuern der Lösung hemmt merkbar die Entwicklung des Pilzes. Neutrale oder schwach alkalische Lösung ($p_H = 7{,}0$ bis 8,0) begünstigt sein Wachstum.

5. Bei der Entwicklung des Pilzes in Lösungen, welche physiologisch-alkalische Salze (Nitrate) enthalten, tritt eine merkbare Alkalisierung der Lösung ein.

6. Der hohe ökonomische Koeffizient der Ausnutzung des Paraffins (bis 63,3 Proz.) steht sicherlich mit dem im Vergleich zu Maltose und Dextrose weit größeren Energiegehalt dieses Stoffes im Zusammenhang; der ökonomische Koeffizient der ersteren überschreitet 28,2 Proz. nicht.

7. Die beobachtete Alkalisierung der Lösung in den Kulturen sowie die direkten Untersuchungen schließen eine Bildung von freien Fettsäuren als Zwischenprodukte aus. Am wahrscheinlichsten ist die Annahme, daß die Zwischenprodukte eine Mischung verschiedener Ester darstellen (höhere Alkohole und höhere Fettsäuren).

8. Die anderen von mir untersuchten Mikroorganismen, sowohl Schimmelpilze als auch Bakterien, stehen ihren physiologischen Eigenschaften nach dem erwähnten Aspergillus nahe, da auch sie einer Ausnutzung des Paraffins als Kohlenstoffquelle fähig sind und sich gegenüber der Reaktion der Lösung gleich ihm verhalten.

Ich fühle mich angenehm verpflichtet, Herrn Prof. *E. E. Uspenski* für das mir anvertraute Thema und seine Leitung während der Arbeit meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Literatur.

1) *Miyoshi*, Pringsheims Jahrb. **28**, 269, 1895. — 2) *O. Rahn*, Centralbl. f. Bakt. **16**, Abt. II, S. 382, 1906. — 3) *K. Störmer*, ebendaselbst **20**, Abt. II, S. 282, 1907. — 4) *N. L. Söhngen*, ebendaselbst **37**, Abt. II, S. 595, 1913. — 5) *R. Wagner*, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **4**, 289, 1914. — 6) *Jeno Tauss*, Centralbl. f. Bakt. **49**, Abt. II, Nr. 22/25, S. 497, 1919.

3·3· = 0·07·

1·65· = 0·07

0·825·

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

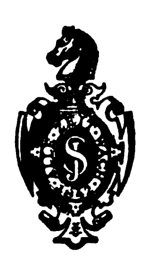
herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertfünfundfünfzigster Band

Fünftes bis sechstes Heft

Ausgegeben am 28. Februar 1925.



Berlin
Verlag von Julius Springer
1925

Die
Biochemische Zeitschrift
erscheint zwanglos in Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band.

In der Regel könne: Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber,
Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,
zu richten.

Die Verfasser erhalten bis 100 Sonderabdrucke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von $1^1/_2$ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur bis 75. Doch bittet der Verlag, nur die zur tatsächlichen Verwendung benötigten Exemplare zu bestellen. Über die Freiexemplare hinaus bestellte Sonderdrucke werden berechnet. Die Herren Mitarbeiter werden jedoch in ihrem eigenen Interesse dringend gebeten, sich, wenn irgend möglich, mit der kostenfrei zur Verfügung gestellten Anzahl zu begnügen, und falls mehr Exemplare unbedingt erforderlich sind, deren Kosten vorher vom Verlage zu erfragen, um unliebsame Überraschungen zu vermeiden.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer
Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

155. Band. **Inhaltsverzeichnis.** **Heft 5/6.**

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite

ὃν οἱ ϑεοὶ φιλοῦσιν
ἀποϑνήσκει νέος.

Julius Morgenroth †.

Die Werke der Verschiedenen bilden die Brücke, die sie mit den Lebenden verbindet. Die Brücke, die *Julius Morgenroth* schuf, ist fest und wohlgefügt; Generationen von Forschern werden über sie fortschreiten.

Der 20. Dezember des Jahres 1924 hat uns *Julius Morgenroth* genommen. 53 Jahre alt ist er infolge einer tückischen Krankheit auf der Höhe seines Schaffens dahingegangen. *Morgenroth*, der am 19. Oktober 1871 in Bamberg geboren war, hat sich bereits in jungen Jahren einen bedeutenden Namen erworben. Als Mitarbeiter *Paul Ehrlichs* veröffentlichte er grundlegende Untersuchungen über die Hämolysine, denen später bedeutende Mitteilungen über die Theorie der Reaktion zwischen Toxin und Antitoxin, über die Trennung des gebildeten Komplexes sowie über den Mechanismus der Bienengiftwirkung folgten. Seine Feststellungen bezüglich der Labwirkung sind in methodischer Hinsicht von größtem Werte gewesen. Maßgeblich beeinflußt wurden unsere Auffassungen vom Wesen der Infektionserkrankungen durch *Morgenroths* Theorie der Depressionsimmunität, jenes Zustandes, der sich aus den Abwehrreaktionen des höheren Lebewesens und der außerordentlichen Wandlungsfähigkeit der Mikroorganismen ergibt. Waren schon *Morgenroths* Untersuchungen über die intramuskuläre Applikation von Heilserum, durch die eine schnellere Resorption der Schutzstoffe erreicht wird, zu praktischer Bedeutung gelangt, so trifft dies namentlich für seine groß angelegten Forschungen auf dem Gebiete der Chemotherapie zu. Ihm glückte die Erreichung eines bis dahin vergebens erstrebten Zieles, die

Abtötung von Bakterien in einem höher entwickelten lebenden Organismus. Diese Großtat — sie betrifft die Heilung der Maus durch Äthyl-hydrocuprein (Optochin) nach Infektion mit den Erregern der Pneumonie — ist ganz unabhängig von der Frage, ob sich dieses Mittel in allen Fällen auch bei der menschlichen Pneumonie bewährt. Seine Untersuchungen über die Wunddesinfektion mittels anderer Chininpräparate, dem Isoamyl-hydro-cuprein (Eucupin) sowie dem Isooctyl-hydro-cuprein (Vucin), ferner mit dem Rivanol (2-Äthoxy-6,9-amino-acridin), stellen erhebliche Fortschritte dar.

Alle Arbeiten *Morgenroths* zeichnen sich durch Originalität des Gedankens und Sorgfalt der Versuchsanordnung aus. Der Wissenschaft hätte dieser Mann, in dem ein reicher Geist neben hoher Lehrbefähigung, große allgemeine Bildung neben Wohlwollen und Liebenswürdigkeit in seltener Harmonie vereint waren, noch unendlich viel leisten können; aber „vor der Zeit rufen die Götter ihre Lieblinge zu sich“.

C. N.

Über die kolorimetrische Methode der Sauerstoffbestimmung.

Von

W. W. Efimoff.

(Aus der Swenigorodischen hydro-physiologischen Station des Instituts für experimentelle Biologie zu Moskau.)

(Eingegangen am 22. Dezember 1924.)

P. Ehrlich hat schon vor langer Zeit die Biologen darauf aufmerksam gemacht, daß der Farbstoff Methylenblau bei der Reduktion farblos wird und in die sogenannte Leucobase übergeht.

Bei der Ansäuerung in Gegenwart von Sauerstoff bekommt die Leucobase wieder eine dunkelblaue Färbung. Diese Eigenschaft des Methylenblaus wurde für das Studium der reduzierenden Eigenschaften vieler Tiergewebe ausgenutzt; wie bekannt, wirken besonders stark reduzierend das Protoplasma der Wirbellosen[1]), speziell der Protozoen, und die Zucker[2]). In der letzten Zeit benutzte *Drew*[3]) das Methylenblau zur quantitativen Unterscheidung der reduzierenden Eigenschaften normaler und krebsartiger Zellen. *Verzar*[4]) bewies, daß auch andere Farbstoffe, namentlich saures Fuchsin, Methylgrün und Lichtgrün, die gleichen Eigenschaften wie das Methylenblau besitzen. Die Eigenschaft der Leucobase dieser Farbstoffe — zusammen mit Sauerstoff die ursprüngliche gefärbte Verbindung zu geben — wurde sehr wenig ausgenutzt. *Osterhout*[5]) machte den Versuch, die größere oder kleinere Quantität des vorhandenen Sauerstoffs mit Hilfe des Blutes von Krebskranken zu bestimmen. *Fox*[6]) nahm eine durch Indigocarmin imprägnierte Lösung und fügte Glucose (1 Proz.) und Kaliumcarbonat (1 Proz.) hinzu, schüttelte darauf und erhielt die gelbe Leucobase des Indigocarmins; einen Tropfen dieser Leucobase fügte er unter dem Deckglas den Flagellaten zu und betrachtete ihre Verteilung je nach der Quantität des Sauerstoffs in der Nähe oder entfernt von der Leucobase (die Leucobase absorbiert gierig den Sauerstoff).

Bei der Untersuchung der physikalisch-chemischen Konstanten in den Kulturen der Protozoen boten sich mir große Schwierigkeiten bei der Sauerstoffbestimmung. Der gestellten Aufgabe zufolge enthielten die Kulturen 250 bis 300 ccm Flüssigkeit, indessen war es nötig, viele

---

1) *A. Bethe*, Arch. f. mikroskop. Anat. u. Entwicklungsgesch. **44**, 1895.
2) *G. Woker*, Pflügers Arch. **155**.
3) *A. H. Drew*, Ber. f. d. ges. Physiol. **3**, 1920.
4) *F. Verzar*, diese Zeitschr. **90**, 1918.
5) *W. Osterhout*, Journ. of gen. Physiol. **1**, 1918.
6) *H. Munro Fox*, ebendaselbst **3**.

Bestimmungen der Menge des Sauerstoffs während der Entwicklung der Kultur der Paramaecien vorzunehmen, ohne den Gehalt der Lösung zu ändern. Die sehr genaue Methode von *Winkler* erfordert nicht weniger als 25 bis 30 ccm Lösung, da diese Methode bei kleineren Mengen an Genauigkeit verliert. Da ergab sich die Notwendigkeit einer neuen Methode, die zwar nicht so genau wie die *Winkler*sche Methode ist, aber ein viel rascheres Arbeiten bei sehr kleinen Flüssigkeitsmengen ermöglicht.

Die Vorbereitung der Leucobase des Indigocarmins.

Man bereitete eine Lösung des Indigocarmins vor (0,001 g in 1 ccm); sie wird in eine Flasche mit einem sehr festen Glasstöpsel eingefüllt und so viel Glucose und Kaliumcarbonat hinzugefügt, daß eine Konzentration von je 1 Proz. erreicht wird. Darauf wird die Flasche fest verschlossen, so daß unter dem Stöpsel keine einzige Luftblase bleibt, an eine dunkle Stelle gebracht. Nach 24 Stunden bildet sich zuerst eine rote und dann eine gelbe Leucobase. Um eine Leucobase für längeren Gebrauch zu erhalten, gießt man auf die Oberfläche der gefärbten Lösung eine dicke Schicht von Vaselinöl. Das Öl gibt den ganzen absorbierten Sauerstoff an die Leucobase ab, und diese färbt sich blau an der Grenzschicht mit dem Öl. Nach und nach verschwindet diese blaue Färbung, und das Öl schützt die Leucobase beim Öffnen der Flasche vor dem Sauerstoff. Bei Zimmertemperatur absorbiert die Leucobase gierig den Sauerstoff aus der Luft und verwandelt sich in blaues Indigocarmin. Deshalb darf man die Flasche ohne Öl nur einen Augenblick öffnen. das Öl aber ermöglicht das sichere Herausnehmen der Leucobase aus der Flasche. Um den Prozeß der Bildung der Leucobase zu beschleunigen, kann man in einem Wasserbade (vorsichtig) die Flasche mit Indigocarmin erwärmen. Dann geschieht dessen Entfärbung schon nach 30 Minuten; zuerst erscheint die rote und dann die gelbe Farbe. Je heller die Farbe, desto besser ist der Versuch gelungen. Bei großen Mengen wird das Öl oft von Kaliumcarbonat verseift, was aber während der Arbeit nicht schadet. Da das Erwärmen den Übergang des Indigocarmins in die Leucobase begünstigt, d. h., da sich eine endotherme Reaktion vollzieht, so ist im Gegenteil die Säuerung der Leucobase durch Sauerstoff exotherm und geschieht desto schneller, je niedriger die Temperatur ist.

Pipetten zum Entnehmen der Leucobase.

Es ist unmöglich, die Leucobase mit einer einfachen Pipette zu entnehmen, da sie beim Ausfließen an der Berührungsstelle mit der Luft augenblicklich blau wird; das entstehende Indigocarmin ist schwerer als seine Leucobase und beim Sinken nach unten vermischt es sich mit der ganzen Leucobase. Um eine möglichst kleine Kontaktfläche zu

erhalten, haben wir sehr schmale Pipetten hergestellt; diese Pipette besteht an der Spitze aus einer Kapillare, welche sich dann erweitert und schließlich wieder in eine Kapillare übergeht, die sich am Ende erweitert, um das Aufsetzen eines Gummiballons zu ermöglichen. Solche Pipetten werden leicht aus einem Glasröhrchen angefertigt und dann auf 0,2, 0,4, 0,6 cm oder auf 0,1, 0,3 und 0,5 cm kalibriert. Man taucht die Pipette schnell in die Ölschicht über der Leucobase hinein, es werden 2 bis 3 Tropfen Öl eingesaugt, danach entnimmt man sofort die Leucobase (sehr rasch) bis etwas über die Hälfte der oberen Kapillare an der Stelle der Marke. Bevor man die Pipette mit der Leucobase herausnimmt, saugt man einen Tropfen Öl ein. Das Öl in der oberen und in der unteren Kapillare schützt die Leucobase vor dem Sauerstoff der Luft. Es ist unbedingt notwendig, alle Operationen sehr rasch auszuführen. Man nimmt von der Leucobase etwas mehr als auf der Pipette bezeichnet ist, denn beim Herauslassen kann leicht eine gefärbte Oberfläche entstehen, die in der auf Sauerstoff zu untersuchenden Lösung durchaus zu vermeiden ist.

Die Standardlösungen des Indigocarmins.

Man nimmt mehrere schmale Röhrchen von 0,3 bis 0,5 cm Durchmesser und von 5 cm Höhe, alle unbedingt gleichen Durchmessers. Danach bereitet man eine Lösung von Indigocarmin vor (0,1 g auf 100 ccm Wasser) und gießt in die einfachen Röhrchen 3 ccm von der Indigolösung; darauf gießt man 2,5 ccm, 2 ccm, 1,6 ccm, 1,2 ccm, 0,8 ccm, 0,4 ccm, 0,3 ccm und 0,2 ccm hinein, indem man jedes Röhrchen bis auf 10 ccm mit Wasser füllt. Demgemäß entstehen neun Konzentrationen der Indigocarminlösung, die man in die neun oben erwähnten schmalen Röhrchen übergießt, welche auf diese Weise den allmählichen Übergang von dunkelblau ins kaum sichtbare Hellblau zeigen. Die so vorbereiteten Röhrchen bilden die Standardlösungen, mit denen man die zu untersuchenden Lösungen vergleicht.

Die vergleichende Bestimmung der Sauerstoffmenge.

Man nimmt ein Röhrchen von gleichem Durchmesser wie die Standardröhrchen und gießt vorsichtig mittels eines Siphons 1 ccm der zu untersuchenden Lösung aus der Kultur der Protozoen zu. Die zugegossene Flüssigkeit darf nicht an den Wänden des Röhrchens herabfließen, sondern muß allmählich ohne Erschütterung von seinem Boden aufsteigen. Darauf wird auf die Oberfläche sofort das Öl gegossen, das sich auf der Leucobase befand, demnach also frei von Sauerstoff ist. Nunmehr führt man rasch unter das Öl die Kapillare des Röhrchens (à 0,3) mit der Leucobase hinein, welche man möglichst schnell aus der Pipette herausläßt. Dann bringt man ein sehr dünnes Glasröhrchen mit einer kleinen Kugel am Ende unter das Öl hinein, und beim beständigen

Drehen des Röhrchens mischt man die zu untersuchende Lösung mit der Leucobase hinein. Die Lösung wird dunkelblau. Man vergleicht sie sofort mit den Standardröhrchen und notiert das Resultat der Vergleichung. Die Vergleichung wird auf einem rötlichgelben Hintergrunde oder mit einer schwachen Lösung von Kaliumbichromat ausgeführt. Bei großen Sauerstoffmengen, bei welchen 0,3 ccm der Leucobase nicht ausreichen, nimmt man eine 0,5 ccm Pipette und vermindert die Menge der Lösung derartig, daß im ganzen stets 1,3 ccm vorhanden sind. Bei sehr kleinen Sauerstoffmengen wird die Lösung nur grün; in diesem Falle nimmt man weniger Leucobase, aber man vergrößert die Menge der zu untersuchenden Lösung. Also wird die relative Menge des Sauerstoffs durch die Konzentration des Indigocarmins in den Standardlösungen ausgedrückt.

Bestimmung der Sauerstoffmenge in Milligrammen.

Falls man das Verhältnis des Sauerstoffs in Milligrammen oder Kubikzentimetern zum Liter bestimmen will, so wird die Sauerstoffbestimmung in mehreren Lösungen und mit verschiedenen Mengen Sauerstoff erst nach unserer kolometrischen Methode und dann nach der Methode *Winkler* vorgenommen. Dadurch erfährt man, wie groß jede Standardlösung in Milligrammen des Sauerstoffs ist. Wenn man die ganze Zeit nur mit einer Farblösung arbeitet, so genügt es, die Vergleichung mit der *Winkler*schen Methode nur einmal durchzuführen. Da es sehr schwierig ist, die Lösungen mit neun verschiedenen Mengen von Sauerstoff zu erhalten, so werden die Konzentrationen der Farblösung auf die Abszisse der graphischen Abbildung ebenso wie die Anzahl Milligramme auf die Ordinate aufgetragen, und durch einfache Interpolation werden die fehlenden Koordinaten bestimmt. Nachdem wir die oben beschriebene Methode ausgearbeitet hatten, führten wir mittels der Methode *Winkler* etwa 25 Vergleichsbestimmungen verschiedener Kulturen von Infusorien aus; von den nach Schwefelwasserstoff riechenden (ohne Sauerstoff) bis auf diejenigen, die eine Menge Algen enthalten und deshalb von Sauerstoff imprägniert sind. Dabei konnten wir einen übereinstimmenden Verlauf dieser beiden Methoden dartun, d. h. bei allmählicher Verminderung der Sauerstoffmenge (nach der Methode *Winkler*) in Milligrammen zeigte sich auch eine allmähliche Abschwächung der blauen Farbe der Standardlösungen.

Die Methode mit Indikatoren dient, obwohl sie noch der Vervollkommnung und größerer Genauigkeit bedarf, dennoch zur approximativen Bestimmung der Sauerstoffmenge bei solchen Untersuchungen, die, wie es bei uns der Fall war, die Anwendung aller anderen Methoden *und besonders* der *Winkler*schen Methode aus irgend einem Grunde nicht zulassen. Vieles in der beschriebenen Methode hängt von der

Übung ab sowie von der Schnelligkeit, mit der die Pipette mit der Leucobase gefüllt wird, ferner von dem Einbringen der Leucobase in die Lösung, von der Vergleichung der Standardlösungen des Farbstoffs usw.

Je größer die Übung ist, desto besser gelingen die Versuche. Daher ist diese Methode für solche Untersuchungen zu empfehlen, bei denen man zahlreiche Bestimmungen des Sauerstoffs in kleineren Lösungen vorzunehmen hat. Ein Fehler der Methode von 0,5 bis 1 mg Sauerstoff pro Liter ist gestattet. Bei Anwendung von 2,5 bis 10 ccm anstatt 1 ccm der Lösung wird der Fehler bedeutend kleiner. Für die Bestimmung der Leucobase wird die Menge der zu untersuchenden Lösung dementsprechend vergrößert. Der Durchmesser der Standard- und der Experimentalröhrchen muß natürlich gleich sein. Die Dauer der Bestimmung beträgt etwa 3 Minuten.

Es ist hinzuzufügen, daß wir in die Lösung statt Indigocarmin die Methylenblau-Leucobase einzuführen versuchten, aber trotz ihrer Vorzüge vor dem Indigocarmin (die Methylenblau-Leucobase ist absolut farblos, während die Indigocarminleucobase gelb ist) gab die Methylenblau-Leucobase keine solchen Übergänge der blauen Farbe bei ihrer Verbindung mit dem Sauerstoff, wie das Indigocarmin.

Zusammenfassung.

1. Es können bei biologischen Arbeiten Fälle vorkommen, bei denen die *Winkler*sche Methode der Sauerstoffbestimmung unanwendbar ist.

2. Bei der Ausarbeitung der kolorimetrischen Methode der Sauerstoffbestimmung wurde das Indigocarmin verwendet, welches bei der Reduktion in Leucobase übergeht.

3. Es wurde eine Leucobase vorbereitet, welche der zu untersuchenden Lösung mittels einer speziellen Pipette beigefügt wurde. Nach ihrer Verbindung mit dem Sauerstoff bildete sich aus der Leucobase wieder das blaue Indigocarmin, dessen Farbintensität mit neun Standardlösungen des Indigocarmins von verschiedenen Konzentrationen verglichen wurde.

4. Je mehr Sauerstoff in der Lösung vorhanden ist, desto intensiver wird die blaue Färbung. Der komparative Gehalt an Sauerstoff äußert sich in den Konzentrationen des Indigocarmins in den Standardlösungen.

5. Es wurden 25 Parallelbestimmungen des Sauerstoffs nach *Winkler* und nach der kolorimetrischen Methode ausgeführt und dabei ihre Übereinstimmung festgestellt. Jeder Konzentration der Standardlösung des Indigocarmins entsprach die Menge Sauerstoff in Milligrammen der parallelen Bestimmung.

6. Man kann den Sauerstoff in 1 ccm Lösung bestimmen.

Zum Schluß sprechen wir unseren herzlichsten Dank dem Chef der Station, Herrn Prof. *S. N. Skadovsky*, für die wertvollen Ratschläge aus.

Vitale Färbung und photodynamische Erscheinungen.

Von

Alexandra Efimoff und W. W. Efimoff.

(Aus der Swenigorodischen hydro-physiologischen Station des Instituts für experimentelle Biologie zu Moskau.)

(Eingegangen am 22. Dezember 1924.)

In der letzten Zeit beschäftigen sich die Biologen immer mehr und mehr mit der Frage über die vitale Färbung.

Es erschienen mehrere Verbesserungen der Arbeit über die Methode der vitalen Färbung von *Mollendorf*[1]) und *Vonwillex*[2]), welche diese Frage, vom Bau der Zelle ausgehend, behandelten. Der mächtige Einfluß der physikalischen Chemie und besonders der Kolloidchemie auf die Biologie wirkte auch auf das Studium der vitalen Färbung. Wie aus den letzten Untersuchungen auf diesem Gebiete ersichtlich ist, ist die vitale Färbung berufen, eine entscheidende Rolle zu spielen bei dem Studium solcher fundamentalen biologischen Probleme des Lebens der Zelle, wie die Permeabilität der Umhüllung und des Protoplasmas der Zelle in Verbindung mit ihrer lipoiden oder porös-kolloiden Natur für verschiedene Stoffe; die Probleme der Absorption und der elektrischen Ladung außerhalb und innerhalb der Zelle[3]) usw. Das Buch von *Höber*[4]) gibt eine vollkommene Schilderung des Reichtums der Fragen, die mit der vitalen Färbung der Zelle verbunden sind.

Die Protozoen sind die besten Objekte für die vitale Färbung.

Vor allem ist es nötig, darauf hinzuweisen, daß die Bedingungen für eine gute Färbung der Protozoen noch sehr wenig erforscht sind, sowohl vom biologischen, als auch vom physikalisch-chemischen Gesichtspunkte. Der Name selbst, „vitale Färbung", fordert, daß das Leben der gefärbten Protozoen von langer Dauer ist, daß sie sich teilen, daß sie sich konjugieren, mit anderen Worten: daß sie sich fast wie die normalen, ungefärbten Protozoen verhalten. Nur dann ist es möglich, alle die Fragen, die mit der vitalen Färbung zusammenhängen, regelrecht zu studieren. In den meisten diesbezüglichen Arbeiten findet sich der Hinweis, daß die gefärbten Protozoen entweder einige Zeit leben oder schnell aus unbekannten, nicht erwähnten Ursachen zugrunde gehen.

---

1) *Mollendorf*, Methoden zu Studien über vitale Färbungen an Tierzellen. Handb. d. biol. Arbeitsmethoden 1921, Abt. V.

2) *Paul Vonwillex*, Intravitale Färbung von Protozoen. Ebendaselbst.

3) *A. Bethe*, diese Zeitschr. **127**, 1922.

4) *R. Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 5. Aufl. Leipzig 1922.

Den Gegenstand dieser Arbeit bildet das Studium einer der Hauptursachen, nämlich der photodynamischen Erscheinungen.

In der vorigen Arbeit[1]) hatten wir schon erwähnt, daß bei Zusatz von fluoreszierenden Stoffen zur Kultur der Protozoen ihr schnelleres Verderben herbeigeführt wird, falls sie im Lichte gelassen werden (photodynamische Erscheinung). Im Dunkeln können dieselben Protozoen monatelang in derselben Farbstofflösung leben. *Tappeiner*[2]) war der erste, der darauf hinwies, daß die Protozoen bei Licht schnell durch Neutralrot und Methylenblau getötet werden. Da seine Arbeit aber in einem medizinischen Monatshefte erschien und er nur flüchtig diese Farbstoffe erwähnte, ohne sich dafür zu interessieren, daß sie vital färben, so blieb seine Arbeit den Biologen so weit unbekannt, daß im Jahre 1923 *Bohn* und *Drzewina*[3]) die giftige Wirkung des Neutralrots bei Licht in ihrer Arbeit mit Erstaunen feststellten.

Man muß hinzufügen, daß sich das Studium der photodynamischen Erscheinungen seit *Tappeiner* zu dem großen Gebiet der Photobiologie entwickelt hat, doch werden dort nicht die Vitalfarben, sondern hauptsächlich Eosin, Fluorescein usw. erforscht.

Da in fast allen protozoologischen Werken die schädliche Wirkung des Lichtes auf die gefärbten Protozoen überhaupt nicht in Betracht gezogen wird, so dünkt es uns, daß diese Arbeit die Aufmerksamkeit der Biologen auf diesen wichtigsten Faktor lenken wird.

Zuerst wurden Versuche mit den gebräuchlichsten Vitalfarbstoffen, wie Neutralrot und Methylenblau, ausgeführt. Da auf die Lebensfähigkeit des Infusoriums Paramaecium caudatum die Konzentration der Farbstofflösung zusammen mit dem Nährboden, in welchem es kultiviert wird, wirkt, so wurde zunächst diejenige Farbstoffkonzentration ausgewählt, die das längste Leben im Dunkeln gewährleistete. Darauf wurden einige Objekte auf Uhrgläsern in zerstreutes Tageslicht gestellt, die anderen in einen Zylinder aus schwarzem Karton. Die Lebensdauer der Protozoen bei einer Konzentration von 0,00025 g Neutralrot auf 1 ccm der Kultur betrug:

Dunkel . . . . 11 Tage (vor Beendigung des Versuchs)
Licht. . . . . 16 Stunden

Im Dunkeln hatten sich die Paramaecium caudatum und die Stylonichien fortwährend geteilt; sie sahen ganz normal aus (die Form) und waren imstande, noch länger zu leben. Im zerstreuten Licht wurden sie nach 16 Stunden bewegungslos und deformierten sich.

Je stärker das Licht, desto schädlicher wirkt es auf die gefärbten Protozoen; für dasselbe Neutralrot ergab sich folgende Lebensdauer der Protozoen:

Greller Sonnenschein . . 10 Minuten
Dunkel . . . . 5 Tage (vor Beendigung des Versuchs)

[1]) *W. W. Efimoff*, diese Zeitschr. **140**, 453, 1923.
[2]) *H. Tappeiner* und *A. Jodlbauer*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **80**, 1904.
[3]) *G. Bohn* et *Anna Drzewina*, C. r. Soc. Biol. **89**, 1923.

Diese Versuche zeigen also, daß es für das Erhalten einer wirklich dauerhaften Vitalfärbung notwendig ist, die Objekte möglichst kurz dem Lichte auszusetzen. Aber da es dennoch vorkommen kann, daß man gezwungen ist, die vital gefärbten Protozoen im Lichte aufzubewahren, so haben wir zum Schutz gegen das Licht Eiweißstoff verwendet[1]).

Folgende Tabelle zeigt die Lebensdauer von Paramaecium und Stylonichien in verschiedenen Vitalfarben im zerstreuten Licht, mit Eiweißstoff und im Dunkeln:

Farben	Licht	Licht + Eiweiß	Dunkel
Neutralrot	40 Stunden	$4^1/_2$ Tage	$6^1/_2$ Tage (teilen sich vor Beendigung des Versuchs)
„	36 „	10 „	
Methylenblau	6 „	24 Stunden	24 Stunden
„	20 „	2 Tage	4 Tage
„	6 „	3 „	3 „
Toluidenblau	8 „	36 Stunden	2 „ (teilen sich)
Vesuvin	6 „	—	36 Stunden (Konjugation)

Die Schutzwirkung des Eiweißstoffs gegenüber der schädlichen Wirkung des Lichtes tritt deutlich hervor, aber wenn man nicht in zerstreutes Tageslicht, sondern in die Sonne (die Wärmestrahlen absorbiert) stellt, so schützt selbst der Eiweißstoff wenig.

Nicht photodynamisch oder schwach wirkend erwiesen sich folgende Vitalfarben: Indigocarmin, Kongorot, Nilblau, Dahlia, Methylviolett, Fuchsin, Viktoriablau, Neutralviolett und Bismarckbraun.

Höchst interessant ist der Farbstoff Indigocarmin: in seiner Lösung lebten und vermehrten sich die Stylonichien und die Paramaecien 16 Tage vor der Beendigung des Versuches. Indigocarmin stellt sich sehr leicht wieder her und geht in die lichtgelbe Leucobase über. Wenn man tropfenweise Indigocarminlösung auf das Uhrglas mit Stylonichien und Paramaecien aufträgt, sieht man, daß gleich nach dem Zusatz die Protozoen grün werden, aber danach verschwindet die Farbe schnell, weil das Protoplasma hier unter ständigem Sauerstoffmangel lebt und deshalb rasch die es durchdringende Farbe wieder herstellt. Erst nach 12 Tagen, bei beständiger Hinzufügung des Indigocarmins, erschien Blaufärbung, aber bald darauf trat wieder Entfärbung ein, obgleich ringsumher eine dichte dunkelblaue Farbe blieb. Diesen Prozeß der Entfärbung der Farbstoffe innerhalb der Zelle kann man zweifach erklären: entweder dringt der Farbstoff sehr langsam in die Umhüllung der Zelle hinein und stellt sich sofort nach dem Eintritt wieder her oder der Farbstoff kann nur zeitweise durch die Umhüllung

[1]) *F. Schanz*, Pflügers Arch. **190**, H. 4/6.

der Zelle (richtiger durch die äußere Schicht des Protoplasmas) eindringen. Es ist klar, daß sich nach 12 Tagen der Zustand des Protoplasmas verändert hat und daß dies auch auf die Umhüllung wirken konnte, die deshalb mehr Farbstoff durchgelassen hatte.

Der photodynamische und vitale Farbstoff Methylenblau besitzt auch die Fähigkeit, sich in Leucobase wieder herzustellen. Zuerst dringt die Lösung entweder besser als Indigocarmin in die Zelle hinein, oder sie widersteht der Reduktion, aber die Färbung ist an und für sich intensiver als beim Indigocarmin. Darauf, je nach dem Leben der Zelle, entsteht hier eine Entfärbung, besonders im Eiweißstoff. Leider ist Methylenblau an und für sich giftig, darum war es bis jetzt unmöglich, selbst im Dunkeln die Infusorien mehr als vier Tage am Leben zu erhalten. Neutralrot ist ein Indikator, der die Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentrationen von p_H 6,8 bis 8,0 anzeigt[1]). Bei schwachen Farbstofflösungen färben sich nur die Vakuolen, bei starken Lösungen färbt sich das ganze Protoplasma rosa, d. h. dies deutet auf eine schwach saure, fast neutrale Reaktion des Protoplasmas hin. Bei Beobachtung der so gefärbten, lange lebenden Infusorien sieht man, daß die Farbe der Lösung in hellgelb umschlägt und oft gar farblos wird. Das Hinzufügen des Farbstoffs erteilt den Infusorien schon keine Färbung mehr; es ist klar, daß sich entweder die Permeabilität der Umhüllung verändert hat oder daß das Protoplasma mit dem gelben Neutralrot überladen ist und keinen Farbstoff mehr absorbieren kann. Der Übergang der rosa Farbe in Gelb zeigt, daß eine alkalische Reaktion des Protoplasmas stattgefunden hat. In einigen Versuchen (selten) wurde wieder ein Wechsel der gelben Farbe in Rosa beobachtet.

In allen Fällen vermindert der Eiweißstoff die Geschwindigkeit der Färbung im Licht. Bei allen Versuchen bemühte man sich, die gleiche Zahl der Infusorien zu nehmen, weil die Dichtigkeit der Kultur auf die Färbung wirkt[2]).

Der Unterschied der Färbung bei Licht und im Dunkeln ist folgender:

Vesuvin	Licht $<$ Dunkel
Toluidinblau	Licht $<$ Dunkel
Neutralrot	Licht $=$ Dunkel
Methylenblau	Licht $>$ Dunkel

In allerletzter Zeit hat *Metzner*[3]) seine Untersuchungen über die Wirkung der Farbstoffe fortgesetzt, unter anderem auch der vitalfärbenden auf die Phototaxis bei Paramaecium caudatum. *Passow* und

[1]) *I. M. Kolthoff*, Der Gebrauch von Farbenindikatoren. Berlin 1923. *W. Clark*, The determination of hydrogen ions. 2. Edition. Baltimore 1923.
[2]) *P. Slonimsky* et *I. Zweibaum*, Centralbl. f. Bakt. **74**, 1923.
[3]) *P. Metzner*, diese Zeitschr. **148**.

Rimpau[1]) studierten ausführlich die photodynamische Wirkung vieler Vitalfarbstoffe auf die Bakterien, indem sie sich bemühten festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Grade der Fluoreszenz, den Vitalfarbstoffen und der photodynamischen Wirkung bei verschiedenen Farbstoffen besteht. *Politzer*[2]), der eingehend die giftige Wirkung des Neutralrots bei Licht und im Dunkeln untersuchte, konnte für die Haut der Salamanderlarve dartun, daß das Licht die durch die Giftigkeit dieses Farbstoffs bedingte Zellschädigung steigert.

Zieht man die giftige Wirkung der photodynamischen Farbstoffe genügend in Betracht, so gelingt es, die vitalgefärbten Infusorien längere Zeit ohne Deformation am Leben zu erhalten. Unter diesen Bedingungen ermöglicht es der Vitalfarbstoff, den verborgenen Chemismus des Protoplasmas zu beobachten: das Einsaugen des Sauerstoffs, die Veränderung seiner aktiven Reaktion usw.

Zum Schluß sprechen wir unseren herzlichsten Dank dem Chef der Station, Herrn Prof. S. N. Skadovsky, für die wertvollen Ratschläge aus.

Zusammenfassung.

1. Die meisten sogenannten Vitalfarbstoffe wirken photodynamisch, d. h. sie töten die Protozoen bei Licht.

2. Der Unterschied in der Lebensdauer der vitalgefärbten Infusorien bei Licht und im Dunkeln ist sehr groß: im Sonnenlicht tritt der Tod nach 10 Minuten ein, im Dunkeln nach 5 Tagen.

3. Man kann die gefärbten Infusorien vor der Wirkung des Lichtes schützen durch Zufügung von Eiweißstoff, die Lebensdauer wird dadurch vielfach erhöht.

4. Bei solchen lange lebenden und vitalgefärbten Infusorien kann man den Chemismus ihres Protoplasmas studieren: die Balance des Sauerstoffs, die Reaktion, die Permeabilität der Umhüllung.

---

[1]) *Passow* und *Rimpau*, Med. Wochenschr. 1924, Nr. 23.

[2]) *G. Politzer*, diese Zeitschr. **151**, H. 1/2, 1924.

Über die Primärwirkung der Radiumstrahlen auf die lebendige Substanz.

Von

G. A. Nadson.

(Aus dem Staatsinstitut für Röntgenologie und Radiologie Leningrad.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1924.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Wie bekannt, sind viele Versuche angestellt, um die Wirkung der Radiumstrahlen bzw. Röntgenstrahlen auf die lebendige Substanz zu erklären (*Schwarz*, *Neuberg*, *Bordier*, *Pordes* u. a.). Bisher liegt keine allgemeine Theorie der Radiumwirkung mit genügend überzeugenden tatsächlichen Beweisen vor; jede enthielt zweifellos einen Teil der Wahrheit, konnte aber keine *allgemeine Grundursache* und Natur der Primärveränderungen der lebendigen Substanz unter dem Einfluß des Radiums dartun.

Versuche, den durch Strahlen hervorgerufenen Effekt mit der Denaturierung der Eiweißstoffe des Protoplasmas zu verbinden, verdienen besondere Aufmerksamkeit, da die Denaturierungserscheinungen der Eiweißstoffe in vitro durch die Strahlenwirkung erwiesen sind (*Hemri* und *Mayer*, *Fernau* und *Pauli* u. a.). Schon 1905 äußerte *Bordier* die Vermutung, daß Röntgenstrahlen in Proteinkolloiden des Plasmas eine Bildung von Niederschlägen, die aus kleinen Körnchen (Granula) bestehen, hervorrufen. Je stärker die Strahlenwirkung, desto größer ist die Anzahl der gefällten Granula, desto weniger normale, unveränderte Eiweißstoffe bleiben im Plasma und um so mehr leidet folglich die Zelle. Ob aber durch die Strahlenwirkung in Zellen, in ihrem Plasma, tatsächlich aus Plasmaeiweißstoffen eine Bildung solcher Granula, die mit Vergrößern der Strahlendosis zunimmt, stattfindet, hat *Bordier* nicht bewiesen, ja sogar nicht gesehen.

Die unter der Strahlenwirkung am *allerersten* auftretenden Veränderungen in der Zelle im Protoplasma *unmittelbar* zu beobachten, war die Aufgabe des Verfassers.

Auf Grund von Untersuchungen, die vorzugsweise an Hefepilzen ausgeführt wurden, zeigte der Verfasser in seiner vorhergehenden Arbeit[1]), daß genügend andauernde Radiumwirkung das Lebenstempo des Organismus beschleunigt und die Zellen zum frühzeitigen Altern und Degenerationsprozessen führt. Dabei wurde eine ganze Reihe von pathologischen Erscheinungen beobachtet: Verzögerung und Abnormitäten der Zellteilung, Hypertrophie der Zelle, oft von einer Deformation begleitet; starke, progressive Vakuolisation des Plasmas. Koagulation und Trübung des Plasmas oder umgekehrt seine Verflüssigung, Plasmolyseerscheinungen, unnormale Aufspeicherung von Fett und sogar eine wahre Fettdegeneration der Zelle, übermäßige Bildung metachromatischer Körnchen usw.

Die Ergebnisse des Verfassers, betreffend die durch die Radiumwirkung verursachten morphologischen Veränderungen der Zelle, wurden später durch Versuche von *Chodat* und *Katzareff*[2]) gestützt. Aber wir haben keinen Grund, alle diese oft sehr weitgehenden Veränderungen als *primäre* zu betrachten.

Neue vom Verfasser angestellte Versuche hatten das Ziel, bei Bestrahlung der Zelle, wie gesagt, die *allerersten, oben erwähnten, noch vorgehenden* Veränderungen der Zelle im Mikroskop bei starker Vergrößerung abzupassen. Als Versuchsobjekt dienten wieder Hefepilze (*Saccharomyces cerevisiae*), da sie günstig für solche Beobachtungen und gegen Radium sehr empfindlich sind. Als Quelle der Radiumaktivität dienten 10 mg $RaBr_2$ in flacher Ebonitkapsel unter dünnem Glimmer.

Versuche wurden auf folgende Weise angestellt: Junge, ein- bis zweitägige Heferiesenkolonien in Kochschalen wurden über dem Radiumpräparat in einer Entfernung von 2 bis 3 mm angebracht, wobei alle Vorsichtsmaßregeln, die Kultur gegen Verunreinigung zu verhüten. selbstredend getroffen wurden. Die ersten, deutlich bemerkbaren Veränderungen der Zelle konnten schon nach 5 Minuten dauernder Bestrahlung wahrgenommen werden. Dann wurden die Hefen nach einer Radiumwirkung von 10, 20, 30 Minuten, 1, 2, 3, 6 und 24 Stunden untersucht. Parallel wurden immer nicht bestrahlte Hefekontrollkulturen untersucht. Das Aussehen einer einer jungen Kultur entnommenen normalen Hefezelle ist allbekannt (Abb. 1a); sie besitzt einen regelmäßigen Umriß, dünne Membrane, ein vollständig durchsichtiges homogenes Protoplasma, oder mit ganz geringer Anzahl kleiner Körnchen, die hier und da verteilt sind, eine zentrale, scharf begrenzte Vakuole

[1]) *G. A. Nadson*, Ann. de Roentgenologie et Radiologie Pétersbourg 1, 47, 1922.

[2]) *F. Chodat* et *A. Katzareff*, C. r. Soc. phys. et hist. natur. **40**, 36. Genève 1923.

und wenig kleine Fetttröpfchen[1]), die Zellvermehrung geschieht durch Sprossung; junge Sproßzellen besitzen ein durchsichtiges Plasma, keine Vakuolen und keine Fetttröpfchen. Nach 5 Minuten dauernder Bestrahlung wird das Zellplasma weniger durchsichtig, etwas *trübe*, und viele Zellen enthalten kleine *neugebildete* Fetttröpfchen; nach 10 Minuten tritt dieses deutlicher hervor und die Zelle gibt folgendes Bild (Abb. 1 b): das trübe Plasma besteht aus einer Menge gleichförmiger,

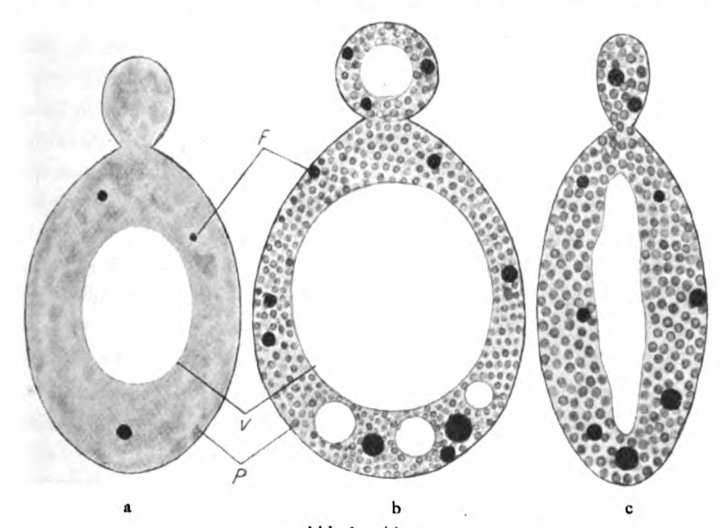


Abb. 1, a bis c.
Schematische Darstellung der Veränderungen der Hefezelle unter dem Einfluß der Radiumstrahlen.
a) Normale Zelle; b) Erste Phase; c) Zweite Phase.
F Fetttröpfchen, *P* Protoplasma, *V* Vakuole.

kugeliger Körnchen (Granula) von geringster Größe, aber trotzdem sind diese Körnchen bei starker Vergrößerung des Mikroskops deutlich zu erkennen (*Leitz* 1/12, Oelimmersion, Compensat. Okular 8 bis 12). Durch starkes Vergrößern der Zentralvakuole und Entstehen neuer Vakuolen ist die Zelle bedeutend angeschwollen, gleichzeitig hat die Größe und Zahl der Fetttröpfchen im Plasma stark zugenommen; die Plasmapermeabilität hat sich vermindert und schwache Neutralrotlösung (1:10000) dringt in die Zelle langsamer durch; der Vakuoleninhalt und die metachromatischen Körnchen färben sich langsamer als früher, d. h. in normaler Zelle. In jungen Sproßzellen bilden sich gleichfalls Vakuolen und Fetttröpfchen, was in normalen Kontroll-

[1]) In unseren Textabbildungen sind die Fetttröpfchen schwarz gefärbt. Wie bekannt, enthalten die Hefezellen echte Fette, d. h. Glyceride der Fettsäuren; sie können durch Osmiumsäure schwarz, durch Sudan III orange oder rosa gefärbt werden. Fett, von dem weiter die Rede sein wird, besitzt dieselben Eigenschaften.

zellen, wie schon erwähnt wurde, nicht stattfindet. Die Veränderungen werden allerdings nicht von allen Zellen und sogar in ein und demselben Präparat von verschiedenen Zellen nicht im gleichen Grade geäußert, denn verschiedene Zellen besitzen keine gleiche „individuelle“ Empfindlichkeit und Prädisposition zu Radiumstrahlen, was der Verfasser in oben zitierter Arbeit ausführlicher dargelegt hat.

Oben angeführte Zellveränderungen, die das Radium hervorruft, können auch auf *ein und derselben* Zelle in folgender Versuchsanordnung gut beobachtet werden. Im Mikroskoprevolver wird anstatt eines der Objektive eine Radiumkapsel eingedreht und durch Senkung des Tubus über eine bestimmte Zelle des Hefepräparates auf bestimmte Zeit aufgestellt. Das Präparat befindet sich auf einem Objektträger und ist mit einem Glimmerplättchen bedeckt und in Vaselin eingeschlossen. Durch die Revolverbewegung kann nach Wunsch entweder das Objektiv oder die Radiumkapsel über das Präparat eingestellt werden. Bei solcher Versuchsanordnung gehen die Veränderungen der Zelle nur langsamer vor sich, was von der Absorption eines Teiles der Strahlen durch das Glimmerplättchen abhängt.

20, 30, 60 Minuten dauernde Radiumbestrahlung gibt ein gleiches und noch schärfer und deutlicher ausgeprägtes Bild, aber eine weitere Zunahme der Fettmenge ist nicht zu beobachten. Dieses Stadium der Zellveränderung bezeichnen wir als *erste Phase* (Abb. 1b).

Wenn eine Hefekultur nach 10 Minuten dauernder Bestrahlung, nachdem das Radium entfernt ist, der Entwicklung überlassen wird, zeigt sie nach Verlauf von 24 Stunden eine schärfer ausgedrückte Veränderung wie vorher, die sich auf größere Zahl der Zellen des Präparates verbreitete; die Fettmenge nimmt dabei gegen den vorigen Tag und im Vergleich zur Kontrollkultur gleichen Alters bedeutend zu; wir haben somit zweifellos eine *Neubildung* von Fett vor uns. Im ganzen ist es ein Resultat der *physiologischen Nachwirkung* des Radiums, d. h. weitere Entwicklung und Ausbildung der Veränderungen in der Zelle nach einem primären, kurz dauernden, durch Radium verursachten Anstoß.

Nach 3 und mehr Stunden dauernder Bestrahlung tritt die *zweite Phase* der Veränderungen der Zelle auf (Abb. 1c), die durch folgendes charakterisiert wird: Die früher im Umfang vergrößerten, mit großen Vakuolen versehenen Zellen werden kleiner, viele von ihnen fallen zusammen, die Vakuolen vermindern sich stark im Umfang oder verschwinden vollkommen; zuweilen nimmt die verkleinerte Vakuole einen unregelmäßigen Umriß (Abb. 1c), kleinere Vakuolen, besonders in der Sproßzelle verschwinden aus dem Plasma, die Granulierung des Plasmas tritt scharf hervor, das Plasma wird durch Vergrößerung der Granula *grobkörnig*, dagegen bleibt die Fettmenge in der Zelle ungefähr dieselbe wie auch bei kürzerer Bestrahlung. Die Plasmapermea-

bilität vergrößert sich. Schwache Neutralrotlösung färbt teilweise oder vollkommen das Plasma vieler Zellen und gleichfalls schnell die dort befindlichen metachromatischen Körnchen. Da nicht alle Zellen von Veränderungen gleichfalls tief ergriffen werden, entwickeln sich wenig veränderte Zellen, soweit sie die Entwicklungsfähigkeit nicht verloren haben, immer weiter und die Kultur vergrößert sich.

Der Verfasser gibt allen diesen Erscheinungen bzw. dem *Mechanismus der Radiumwirkung* eine folgende Erklärung: Das Protoplasma stellt ein komplexes Polydispersoid vor, in dem die Hauptrolle den Eiweißstoffen und Lipoiden zuzuschreiben ist. Die *Primärwirkung* des Radiums besteht in der *Ionisation* des Plasmas, wodurch *der Komplex der Eiweißstoffe und Lipoide zerfällt* (ganz gleich, ob er eine physische oder labile chemische Verbindung dieser Stoffe vorstellt) *und die Lipoide* (in diesem Falle Fett) *in Form einzelner im Plasma zerstreuten Tröpfchen hervortreten.* Gleichzeitig findet eine *Denaturierung* der Eiweißstoffe statt, die aus *kolloidal-emulsoidem* in einen gröberen *Suspensions-* und *Emulsionszustand* übergehen. Dieses wird von einer Entziehung der Wasserhülle der Kolloidteilchen (Dehydratation, Entquellung), einer Aggregation der Ultramikronen in Mikrone und infolgedessen feinkörnigen (granulären) Plasmastruktur begleitet. Dieses bringt eine Verminderung der Plasmapermeabilität und dadurch eine Erhöhung des inneren osmotischen Drucks und Turgors der Zelle mit sich, was durch das Vergrößern der Zentralvakuole, Entstehen von neuen kleineren Vakuolen und Vergrößern des Umfanges der ganzen Zelle sich äußert.

Bei weiterer Radiumwirkung geht diese *erste Phase* in die *zweite* über, die durch folgendes charakterisiert wird: Es tritt allmählich eine *Koagulation* der Eiweißstoffe des Plasmas ein, was eine Vergrößerung der Körnchen (Granula) im Plasma zur Folge hat; gleichzeitig vergrößert sich die Plasmapermeabilität und vermindert sich der Zellturgor, die Vakuolen werden kleiner oder verschwinden ganz und die Zellen fallen zusammen. Die Farbstoffe (Neutralrot) dringen durch das Plasma leicht durch und färben es. Die in der ersten Phase sich befindenden Zellen sind noch lebensfähig, die Veränderungen des Aggregatzustandes ihres Plasmas sind noch *reversibel.* Dasselbe findet auch in der zweiten Phase statt, wenn nur *ein Teil* des Plasmas von Koagulation ergriffen ist und der andere wenig verändert bleibt; dabei geschieht die Regeneration der Zellen gewöhnlich durch Sprossung. Vollständige Plasmakoagulation ist *irreversibel* und hat augenscheinlich immer den Tod der Zelle zur Folge. Allerdings auch hier äußern verschiedene sogar benachbarte Zellen gegenüber der Bestrahlung einen verschiedenen Grad von Widerstandsfähigkeit.

So sind die *primären* Veränderungen der Zelle; alle ihre *folgenden,* wie *physiologischen,* so auch *pathologischen* und *degenerativen* Ver-

änderungen einschließlich ihr Tod durch die Bestrahlung können leicht als natürliche *Folgen* oben angeführter *primärer* Veränderungen der Protoplasmaeigenschaften angesehen werden.

Die Veränderung des Aggregatzustandes der Eiweißstoffe und Lipoide im Plasma führt natürlicherweise Veränderungen der Plasmapermeabilität und der Oberflächenspannungsbedingungen, Verschiebungen von Wachstumsfaktoren, Verlagerung von Substanzgruppen usw. mit sich, was vollständig genügt, um weitere tiefere Veränderungen im Bau und in den Funktionen der Zelle hervorzurufen; dasselbe bezieht sich auch auf den Zellkern, welchen viele, nach Ansichten des Verfassers aber ohne genügende Beweise, als besonders und *primär* empfindlich gegen Radium halten. Der durch Radium verursachte Effekt hängt selbstredend wie von der Menge und Qualität der Radiumenergie, so auch von der „individuellen" Empfindlichkeit der betreffenden Zelle oder dem Organismus ab (ausführlicher in der oben erwähnten Arbeit des Verfassers).

Wie schon gesagt, *beschleunigt* Radium das *Lebenstempo*, und seine kleinen Mengen wirken erregend, stimulierend. Größere Mengen üben eine hemmende oder depressive Wirkung aus, welcher pathologische und degenerative Vorgänge, ja sogar Tod folgen; alles dies ist nichts anderes als ein Resultat der *Zellübererregung*.

Wie schon der Verfasser im Jahre 1920 formulierte, müssen wir den erregenden und hemmenden (einschließlich pathogenen) Einfluß des Radiums nicht als zwei *entgegengesetzte* Wirkungen betrachten. *Es gibt nur eine Wirkung des Radiums auf die lebende Substanz:* Das Radium gibt dieser letzten einen gewissen Anstoß, und die Zelle beginnt nach einer bestimmten Richtung hin sich zu verändern. Anfangs vollziehen sich diese Veränderungen in den Grenzen normaler physiologischer Prozesse, und da nun das Radium, wie wir sahen, die Fähigkeit besitzt, das Lebenstempo zu beschleunigen, so haben wir die Erscheinungen der Erregung (Stimulierung) vor uns. Wenn der Anstoß gering war, so bleibt es hierbei. Bei genügend starker Bestrahlung geht der Prozeß aber schnell vorwärts, es treten Veränderungen auf, die früher oder später zum vorzeitigen Altern oder sogar zum Tode der Zelle führen. Daneben können gelegentlich auch jene Veränderungen des Baues und der Funktionen auftreten, die wir als pathologische bezeichnen. Alles dieses ist aber nur die *natürliche Entwicklung*, nur die *Vollendung* des *anfänglichen* Prozesses, nur verschiedene Stadien und Formen ein und desselben Lebensprozesses, eine ununterbrochene Reihe genetisch verbundener Erscheinungen.

Zum Schluß sei noch erwähnt, daß der *Mechanismus der Wirkung von Röntgenstrahlen* auf die Zelle im Grunde *derselbe*, wie der der Radiumstrahlen ist, worüber in einer anderen Abhandlung berichtet werden wird.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 71.

Das Zusammenwirken von Schilddrüse und Nebenniere, geprüft am respiratorischen Stoffwechsel.

Von

Kimio Nakayama.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 8. Januar 1925.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Bekanntlich haben *Asher* und *Flack* in ihrer das ganze Gebiet inaugurierenden Arbeit über die Innervation der Schilddrüsen auf Grund von eingehenden experimentellen Untersuchungen die Lehre aufgestellt, daß eine der Funktionen des inneren Sekrets der Schilddrüse die Aktivierung des autonomen Nervensystems sei[1]). Eine Konsequenz dieser Lehre ist die, daß unter anderem Adrenalin eine verschiedene Wirkung haben muß, je nachdem ein Tier im Besitz oder nicht im Besitz seiner Schilddrüse ist, oder je nachdem ein mit Schilddrüsenpräparaten vorbehandeltes oder nicht vorbehandeltes Tier vorliegt. Beweise für die Richtigkeit dieses Teiles der Lehre wurden gleichfalls in der oben genannten Arbeit erbracht. Beiläufig bemerkt, handelt es sich aber nicht bloß um die Aktivierung von sympathischen Mechanismen, sondern auch um parasympathische Mechanismen. Mehrfache Arbeiten des Berner physiologischen Instituts haben Beiträge zugunsten dieser Lehre erbracht. In neuerer Zeit findet man in der Literatur mehrfach Angaben, welche nicht mit der Lehre von der aktivierenden Funktion des Schilddrüsensekrets auf das autonome Nervensystem bzw. dessen peripheren Mechanismus übereinstimmen. Die Einwände betreffen meist die Fragen der Spezifizität des Schilddrüsensekrets, indem neuerdings unter anderen namentlich

---

[1]) *L. Asher* und *M. Flack*, Zeitschr. f. Biol. 55, 83, 1911.

von *Abderhalden* und seinen Mitarbeitern gefunden worden ist, daß eine große Reihe von Stoffen die Adrenalinwirkung zu verstärken vermögen. Auf die Einwendungen in dieser Richtung soll nicht weiter eingegangen werden. Ich will nur die Bemerkung einflechten, daß der Nachweis der Nichtspezifizität des Schilddrüsensekrets auf Aktivierung der Adrenalinwirksamkeit durchaus nicht seine dominierende Wirkung in dieser Beziehung ausschließt. Denn worauf es ankommt ist, daß das Schilddrüsensekret, welches im Organismus vorhanden und je nach den Bedürfnissen in wechselnden Mengen von der Schilddrüse abgegeben wird, tatsächlich im Organismus für die Aktivierung der sympathischen und parasympathischen Mechanismen zur Verfügung steht. Der andere Einwand bezieht sich darauf, daß die Methode, mit welcher die Aktivierung der autonomen Mechanismen durch Schilddrüsensekret untersucht wird, der hinreichenden Sicherheit entbehrt. Es wird darauf hingewiesen, daß Schwankungen in der Erregbarkeit des autonomen Nervensystems stattfinden und daß infolge dieser Schwankungen Änderungen in der Erregbarkeit vorkommen können, welche nichts mit der Aktivierung zu tun haben. Derartige Schwankungen sind natürlich möglich, aber sie wurden in den Arbeiten des Berner physiologischen Instituts durch die Anordnung der Versuche sowie durch die Verschiedenartigkeit der Methodik ausgeschlossen. Immerhin erschien es bei der Wichtigkeit des Gegenstandes angebracht, die Beweise für die Richtigkeit der Lehre von der Wirkungssteigerung sympathischer und parasympathischer Mechanismen durch Schilddrüsensekret zu vermehren, womöglich durch eine Methodik, die anders ist als die bisher verwandte.

Die bisherigen Methoden um die Aktivierung sympathischer und parasympathischer Mechanismen durch Schilddrüsensekret zu beweisen, beruhten entweder darauf, daß die Erregbarkeit passender sympathischer und parasympathischer Nerven geprüft wurde unter wechselnder Beeinflussung durch das innere Sekret der Schilddrüse, oder darauf, daß die Wirkungen des Adrenalins auf Gefäßverengerung am Frosch- oder Säugetierpräparat oder auf die Verstärkung oder Beschleunigung des überlebenden Säugetierherzens geprüft wurden. In der nachfolgenden Arbeit habe ich auf Anregung von Prof. *Asher* die Stoffwechselwirkung des Adrenalins in seiner Abhängigkeit vom Schilddrüsensekret als Mittel benutzt, um zu untersuchen, ob die Wirkung des Adrenalins auf den Stoffwechsel eine Abhängigkeit von der Schilddrüse zeigte.

Es liegen Untersuchungen von *Boothby* und *Sandiford*[1]) vor, welche zeigen, daß Adrenalin einen merklichen Einfluß auf den Stoff-

---

[1]) *Boothby* and *Sandiford*, Amer. Journ. of Phys. **50**, **463**, 1922.

wechsel besitzen kann. Da ich an anderen Lebewesen als *Boothby* arbeitete, nämlich an Ratten, mußte ich mich zunächst informieren, wie bei Ratten Adrenalin auf den Stoffwechsel, und zwar auf den respiratorischen Stoffwechsel wirkt. Zur weiteren Information habe ich in meinen Versuchen auch Pilocarpin als Typus eines sogenannten parasympathisch fördernden Giftes angewandt. Es ist herkömmlich, diese Nomenklatur zu gebrauchen, man muß sich aber klar sein, namentlich was die letztere Substanz anbetrifft, daß nicht notwendigerweise die Wirkungen, die man beobachtet, mit den physiologischen Wirkungen parasympathischer Erregung identifiziert werden können.

Meine Untersuchungen wurden nach der im Berner physiologischen Institut üblichen, nach *Asher* modifizierten *Haldane*schen Methode der Untersuchung des respiratorischen Stoffwechsels von Ratten angestellt. Alle zu meinen Versuchen dienenden Ratten wurden mit Milch und Brot gefüttert und vor jedem Versuch fasteten sie 16 Stunden lang. Als Injektionsmittel habe ich Adrenalin Parke, Davies & Co., 1:1000 und Pilocarpinum hydrochloric crystal. puriss. (*Merck*) 1:1000 benutzt, von welchem ich selbst eine Lösung hergestellt habe.

Meine Versuche wurden mit der neuen von *Asher* eingeführten Differentialmethode ausgeführt, wie sie in der Arbeit von *Takahashi*[1]) beschrieben worden ist. Sie besteht darin, daß gleichzeitig während ein Versuchstier einer bestimmten Versuchsanordnung unterworfen wird, ein anderes Kontrolltier während der ganzen Zeit gleichzeitig im Respirationsversuch steht. Die Ergebnisse am gesunden Tiere, welches dauernd unter den Bedingungen des normalen Grundumsatzes stand, finden sich in Tabelle I. Die Ergebnisse an dem Tiere, welches allein den verschiedenen in der Überschrift genannten Versuchseingriffen unterworfen wurde, finden sich in Tabelle II. In Tabelle IIIa finden sich die Mittelwerte der gesamten Versuche am normalen Kontrolltier, in Tabelle IIIb diejenigen am Tiere, welches tatsächlich den verschiedenen Versuchseingriffen unterworfen wurde. In dieser Tabelle gebe ich in Klammer die Korrekturwerte nach der Differentialmethode an.

Man sieht in Tabelle IIIa eine bemerkenswerte Konstanz der Kohlensäurebildung und des Sauerstoffsverbrauchs, die in der herkömmlichen Weise pro Kilogramm und pro Stunde in Grammen angegeben sind, sowie des respiratorischen Quotienten, auch die aus den respiratorischen Versuchen ermittelte Kalorienbildung erwies sich als konstant. Ganz anders steht es mit dem eigentlichen Versuchstier. Die Injektion von Adrenalin, dieselbe wurde subkutan ausgeführt, hatte eine durchschnittliche Steigerung der Kohlensäurebildung von 29,34 Proz. des Sauerstoffverbrauchs, 23,12 Proz. der Kalorienbildung

---

[1]) *Y. Takahashi*, diese Zeitschr. 145, 130, 1924.

Tabelle I. 3. Gruppe. Weiße

Versuchs-Nr.	Datum (1923/1924)	Versuchsdauer Stdn.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g
						Ruheumsatz vor	
1	30. X.	3,0	18	24	184,56	0,38	1,02
2	31. X.	3,0	18	25	183,38	0,30	1,40
3	2. XI.	3,0	18	25	186,86	0,02	1,41
4	5. XI.	3,0	18	25	188,93	0,35	1,29
5	6. XI.	3,0	18	24	188,60	0,53	1,42
6	7. XI.	3,0	18	25	181,77	0,29	1,25
7	9. XI.	3,0	17	23	176,68	0,40	1,23
8	12. XI.	3,0	18	24	166,63	0,25	1,38
9	13. XI.	3,0	17	23	163,09	0,64	1,21
10	16. XI.	3,0	17	24	163,56	0,45	1,25
11	11. XII.	3,0	16	22	160,03	0,38	0,98
12	12. XII.	3,0	17	24	158,08	0,44	1,06
13	14. XII.	3,0	17	25	155,67	0,38	1,06
14	18. XII.	3,0	18	25	151,30	0,53	1,03
15	20. XII.	3,0	19	26	153,62	0,64	1,01
					Kontrolle	während der	Versuch
16	20. XI.	3,0	17	24	162,76	0,46	1,08
17	22. XI.	3,0	17	25	161,05	0,64	1,12
18	23. XI.	3,0	17	25	159,65	0,44	1,05
19	26. XI.	3,0	16	23	167,01	0,89	1,16
20	27. XI.	3,0	16	23	163,24	0,62	1,12
21	29. XI.	3,0	17	24	162,35	0,53	1,07
22	30. XI.	3,0	17	24	161,15	0,71	1,10
23	3. XII.	3,0	17	25	167,60	0,52	1,08
24	5. XII.	3,0	17	24	161,55	0,33	0,96
25	7. XII.	3,0	17	25	161,11	0,26	0,99
					Kontrolle	für den	Ruheumsat
26	12. II.	3,0	18	25	141,33	0,32	1,22
27	14. II.	3,0	18	25	136,65	0,29	0,91
28	16. II.	2,5	16	23	133,25	0,35	0,68
29	18. II.	3,0	17	24	134,35	0,48	0,81
30	19. II.	2,5	17	23	131,32	0,26	0,71
				Kontrolle	für die	Versuche	mit Adrenalin
31	21. II.	3,0	18	24	129,78	0,34	0,86
32	22. II.	3,0	16	22	130,84	0,20	0,79
33	25. II.	2,0	16	24	135,06	0,16	0,74
		2,0	15	22	134,88	0,15	0,71
34	26. II.	3,0	17	23	130,59	0,36	0,90
35	28. II.	4,0	17	23	130,75	0,45	1,10
36	29. II.	3,0	17	24	130,88	0,36	0,82
37	3. III.	3,0	15	22	133,52	0,31	1,16
38	4. III.	3,0	14	22	133,30	0,52	0,97
39	6. III.	3,0	16	22	140,40	0,44	1,04
		1,0	16	22	139,77	0,22	0,37
40	7. III.	3,0	14	22	136,47	0,40	0,98
41	10. III.	2,0	15	23	132,65	0,36	0,59
		1,0	14	22	132,28	0,12	0,33
42	12. III.	3,0	15	22	131,96	0,71	0,77

atte (Weibchen), Kontrolltier.

O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Mittelwert des Respirationsquotienten	Mittelwert der CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	Mittelwert des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde g	Bemerkungen
er Operation.							
0.92	0,825	1,842	1,662				
1.37	0,742	2,545	2,490				
1.32	0,776	1,515	2,355				
1.24	0,756	2,276	2,188				
1.37	0,753	2,507	2,419				
1.25	0,725	2,308	2,308				
1.19	0,751	2,321	2,245				
1.32	0,759	2,761	2,641	0,755	2,336	2,249	Nüchtern
1.16	0,745	2,473	2,412				
1.20	0,745	2,507	2,446				
0.95	0,749	2,041	1,979				
1.05	0,733	2,235	2,214				
1.02	0,755	2,270	2,184				
0.94	0,796	2,269	2,071				
0.98	0,743	2,176	2,127				
Adrenalin vor der Operation.							
1.06	0,740	2,212	2,171				
1.05	0,775	2,318	2,173				
1.02	0,748	2,192	2,130				
1.14	0,739	2,315	2,275				
1.07	0,760	2,287	2,185	0,748	2,197	2,135	Nüchtern
1.04	0,747	2,198	2,186				
1.06	0,754	2,275	2,193				
1.02	0,769	2,148	2,029				
0.94	0,742	2,981	1,940				
1.00	0,719	2,048	2,069				
h der Schilddrüsenentfernung.							
1.16	0,764	2,877	2,756				
0.90	0,735	2,220	2,195				
0.65	0,760	2,041	1,951	0,750	2,242	2,172	Nüchtern
0.76	0,774	2,009	1,886				
0.68	0,758	2,163	2,071				
h der Schilddrüsenentfernung.							
0.83	0,752	2,209	2,132				
0.80	0,717	2,013	2,038				
0.72	0,747	2,740	2,666				
0.68	0,758	2,632	2,521				
0.83	0,788	2,302	2,123				
1.05	0,761	2,103	2,008				
0.78	0,764	2,088	1,787				
1.07	0,788	2,896	2,671	0,762	2,372	2,262	Nüchtern
0.94	0,750	2,426	2,351				
0.98	0,771	2,471	2,327				
0.37	0,725	2,647	2,647				
0.96	0,742	2,394	2,345				
0.58	0,739	2,224	2,186				
0.31	0,773	2,495	2,344				
0.71	0,788	1,945	1,794				

Tabelle II. 3. Gruppe. Rücken-

Versuchs-Nr.	Datum (1923/1924)	Versuchsdauer Stdn.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g
					Ruheumsatz vor		
1	30. X.	3,0	18	25	226,23	0,29	1,72
2	31. X.	3,0	18	25	219,61	0,29	1,64
3	2. XI.	3,0	18	25	214,35	0,22	1,25
4	5. XI.	3,0	18	24	203,36	0,27	1,39
5	6. XI.	3,0	18	24	208,44	0,37	1,52
6	7. XI.	3,0	18	25	204,65	0,52	1,56
7	9. XI.	3,0	17	23	200,81	0,38	1,52
8	12. XI.	3,0	18	24	212,25	0,27	1,30
9	13. XI.	3,0	17	24	204,75	0,35	1,55
10	16. XI.	3,0	17	25	201,71	0,36	1,51
11	11. XII.	3,0	16	24	188,22	0,32	1,41
12	12. XII.	3,0	17	25	186,96	0,34	1,38
13	14. XII.	3,0	17	25	185,44	0,24	1,36
14	18. XII.	3,0	18	26	187,63	0,37	1,21
15	20. XII.	3,0	19	27	196,69	0,28	1,30
					Die Versuche mit Adrenalin		
16	20. XI.	3,0	17	25	211,88	0,39	1,64
17	22. XI.	3,0	17	26	218,39	0,44	1,67
18	23. XI.	3,0	17	26	204,98	0,47	1,75
19	26. XI.	3,0	16	25	206,27	0,49	1,67
20	27. XI.	3,0	18	25	200,65	0,44	1,91
21	29. XI.	3,0	17	25	202,37	0,44	1,68
22	30. XI.	3,0	17	26	201,90	0,45	1,81
23	3. XII.	3,0	17	26	200,64	0,53	1,97
24	5. XII.	3,0	17	24	191,88	0,55	1,67
25	7. XII.	3,0	17	27	190,55	0,48	1,71
					Ruheumsatz nach der Schilddrüsen		
26	12. II.	3,0	18	25	167,57	0,44	0,78
27	14. II.	3,0	18	26	167,70	0,47	0,86
28	16. II.	2,5	16	24	171,16	0,21	0,70
29	18. II.	3,0	17	25	171,62	0,53	0,93
30	19. II.	2,5	17	26	167,97	0,45	0,73
					Die Versuche mit Adrenalin nac		
31	21. II.	3,0	18	26	174,00	0,38	1,03
32	22. II.	3,0	16	23	171,60	0,44	0,91
33	25. II.	2,0	16	24	173,04	0,19	0,83
		2,0	15	24	172,86	0,18	0,70
34	26. II.	3,0	17	24	170,99	0,22	0,89
35	28. II.	2,0	17	25	169,91	0,22	0,64
		2,0	17	23	169,60	0,19	0,66
36	29. II.	3,0	17	25	165,23	0,32	0,91
37	3. III.	3,0	15	22	167,30	0,33	1,08
38	4. III.	3,0	14	23	169,43	0,55	1,14
39	6. III.	3,0	16	22	170,75	0,47	1,13
		1,0	16	23	170,14	0,11	0,38
40	7. III.	3,0	14	24	168,09	0,34	1,09
41	10. III.	2,0	15	24	166,08	0,30	0,61
		1,0	14	22	165,78	0,19	0,40
42	12. III.	3,0	15	24	165,71	0,32	0,99

efärbte Ratte (Weibchen).

O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Mittelwert des Respirationsquotienten	Mittelwert der CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	Mittelwert des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde g	Bemerkungen
ler Operation.							
1,64	0,762	2,534	2,416				
1,59	0,749	2,489	2,413				
1,20	0,757	1,944	1,866				
1,31	0,771	2,278	2,147				
1,49	0,741	2,431	2,383				
1,52	0,746	2,541	2,476				
1,43	0,772	2,523	2,374				
1,28	0,738	2,042	2,010	0,751	2,370	2,292	Nüchtern
1,50	0,731	2,523	2,442				
1,49	0,736	2,495	2,462				
1,38	0,742	2,497	2,444				
1,32	0,759	2,460	2,353				
1,31	0,754	2,445	2,355				
1,21	0,725	2,150	2,150				
1,23	0,768	2,203	2,085				
'or der Operation.							Adrenalin, subkut.
1,56	0,764	2,580	2,454				0,1 mg
1,57	0,773	2,549	2,396				0,1 „
1,66	0,766	2,846	2,700				0,1 „
1,57	0,773	2,699	2,537				0,1 „
1,80	0,771	3,173	2,997	0,782	2,883	2,679	0,2 „
1,56	0,782	2,832	2,570				0,2 „
1,66	0,792	2,988	2,741				0,2 „
1,78	0,804	3,273	2,957				0,2 „
1,58	0,768	2,901	2,745				0,1 „
1,55	0,801	2,991	2,712				0,1 „
·ntfernung. (8. II. operiert).							
0,74	0,766	1,551	1,472				
0,83	0,753	1,709	1,651				
0,67	0,759	1,636	1,566	0,760	1,688	1,613	Nüchtern
0,89	0,759	1,806	1,729				
0,70	0,758	1,738	1,667				
ler Schilddrüsenentfernung.							Adrenalin, subkut.
0,89	0,841	1,973	1,703				0,1 mg
0,88	0,751	1,768	1,709				0,1 „
0,84	0,718	2,398	2,427				0,1 „
0,66	0,771	2,025	1,909				
0,82	0,788	1,735	1,599				0,1 „
0,55	0,845	1,883	1,619				0,1 „
0,59	0,813	1,946	1,739				
0,89	0,743	1,836	1,796	0,786	2,062	1,905	0,1 „
1,10	0,713	2,152	2,192				0,2 „
1,01	0,820	2,243	1,987				0,2 „
0,99	0,829	2,206	1,933				0,2 „
0,34	0,812	2,234	1,998				
0,97	0,816	2,162	1,924				0,1 „
0,61	0,725	1,837	1,837				0,1 „
0,39	0,745	2,413	2,353				
0,87	0,827	1,991	1,746				0,1 „

Die gesamten Ergebnisse von Tabelle I und II.

Tabelle III.

a) 3. Gruppe. Weiße Ratte (Weibchen), Kontrolltier im Differentialapparat.

Versuchsarten	Mittelwert der CO_2-Bildung pro kg u. Stunde g	Mittelwert des O_2-Verbrauchs pro kg u. Stunde g	Mittelwert des Respirationsquotienten	Mittelwert der Kalorienbildung
Ruheumsatz vor der Operation	2,336	2,249	0,755	7,62
Ruheumsatz während der Adrenalinversuche des Versuchstieres vor der Operation	2,197	2,135	0,748	7,22
Ruheumsatz nach der Schilddrüsenentfernung des Versuchstieres	2,242	2,172	0,750	7,34
Ruheumsatz während der Adrenalinversuche des Versuchstieres nach der Operation	2,372	2,262	0,762	7,66

b) 3. Gruppe. Rückengefärbte Ratte (Weibchen).

Versuchsarten	Mittelwert der CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	Mittelwert des O_2-Verbrauchs pro kg ung Stunde g	Mittelwert des Respirationsquotienten	Mittelwert der Kalorienbildung	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung
Ruheumsatz vor der Operation	2,370	2,292	0,751	7,75	—	—	—
Die Adrenalinversuche vor der Operation	2,883 (2,229)	2,679 (2,176)	0,782 (0,744)	9,11 (7,34)	21,65 (29,34)	16,89 (23,12)	17,55 (24,11)
Ruheumsatz nach der Schilddrüsenentfernung	1,688 (2,275)	1,613 (2,214)	0,760 (0,746)	5,46 (7,48)	41,15 (—25,80)	39,79 (—27,15)	40,07 (—26,99)
Die Adrenalinversuche nach der Operation	2,062 (1,786)	1,905 (1,680)	0,786 (0,772)	6,49 (5,70)	22,16 (15,45)	18,10 (13,39)	18,86 (13,86)

von 24,11 Proz. zur Folge. Es handelt sich hierbei um Steigerungen, welche durch die Injektion von 1 oder $^{2}/_{10}$ mg Adrenalin herbeigeführt wurden. Nach der Schilddrüsenentfernung sank der Grundumsatz in der bekannten Weise, die Kohlensäurebildung um 25,8 Proz., der Sauerstoffverbrauch um 27,2 Proz., die Kalorienbildung um 27 Proz. Nach der Operation rief die subkutane Injektion von Adrenalin eine viel geringere Steigerung des Grundumsatzes hervor. Es stieg die Kohlensäurebildung nur um 15,5 Proz., der Sauerstoffverbrauch um 13,4 Proz., die Kalorienbildung um 13,9 Proz. Alle Werte sind korrigiert und abgerundet angegeben. Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, daß die Wirksamkeit des Adrenalins auf den respiratorischen Umsatz am schilddrüsenlosen Tiere merklich niedriger ist, als am normalen. Wiederholt weise ich darauf hin, daß das normale Kontrolltier, welches gleichzeitig im Versuch stand, jederzeit praktisch die gleichen Werte des respiratorischen Umsatzes zeigte.

Die eben geschilderte Versuchsreihe beweist meines Erachtens, daß bei Fehlen der Schilddrüse die Wirkungsstärke des Adrenalins viel geringer ist, zunächst vollständig davon unabhängig, ob Wirksamkeitssteigerung etwas Spezifisches für die Schilddrüse sei oder nicht. Zieht man Analogieschlüsse aus einem sehr weiten Gebiet der Physiologie, so sieht man, daß strenge Spezifizitäten namentlich dann, wenn es sich nicht um feinste Fermentwirkung handelt, eigentlich recht selten sind. Worauf es ankommt ist, daß das Fehlen der Schilddrüse die Wirksamkeit von Adrenalin tatsächlich herabsetzt, und man kann nun kaum anders als dies in Zusammenhang mit einer Leistung der Schilddrüse bringen, wobei man immer noch verschiedene Vorstellungen über den Mechanismus dieser Leistung haben kann. Andererseits ist die von mir hier gebrauchte Methode, um Wirksamkeitssteigerungen von Adrenalin durch die Schilddrüse nachzuweisen, eine unvergleichlich sicherere als die frühere Methode, wo im akuten Versuch nervöse Mechanismen herangezogen wurden. Die Stoffwechselwirkungen sind bei der im Berner physiologischen Institut seit längerer Zeit geübten Methode oft von einer geradezu erstaunlichen Konstanz. Andererseits zeigt ein Blick auf meine detaillierten Protokolle, daß in keinem einzigen Falle die Symptome herabgesetzter Wirkungsstärke des Adrenalins nach Fehlen der Schilddrüse ausblieb. Schließlich sind die Stoffwechselwirkungen, die im Zusammenhang mit der Schilddrüse stehen, diejenigen, welche noch tiefer in das Geschehen der Lebensvorgänge einen Einblick gestatten, als nervöse Reizversuche.

Meine nächste Versuchsreihe beschäftigt sich mit dem Korrelat zu den vorausgegangenen Versuchen, indem ich einen Versuch anschloß, wo normale Ratten mit Schilddrüse gefüttert wurden. Ich bediente mich der Schilddrüsentabletten von *Borroughs* und *Wellcome & Co.*

Tabelle IV. 5. Gruppe. Weiße

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Stdn.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g
						Die Versuche mit Adrenalin		
43	26. III.	3,0	14	21	129,32	0,35	1,07	1,05
		2,0	14	23	127,82	0,25	1,32	1,24
		1,0	14	24	127,49	0,11	0,58	0,58
		1,0	14	24	127,38	0,12	0,45	0,46
44	28. III.	3,0	14	22	131,22	0,35	1,14	1,13
		2,0	14	22	129,83	0,27	1,31	1,25
		1,0	14	24	129,50	0,14	0,75	0,75
45	1. IV.	3,0	11	24	132,82	0,50	1,36	1,34
		4,0	11	24	131,40	1,39	4,41	4,32
46	3. IV.	2,5	10	20	126,39	0,29	1,03	1,00
		4,0	10	21	125,82	0,31	2,62	2,49
				3. Gruppe.	Rückengefärbte	Ratte	(Weibchen).	
43	26. III.	3,0	14	22	158,58	0,34	1,13	1,07
		2,0	14	22	157,92	0,24	0,75	0,67
		1,0	14	23	157,60	0,13	0,38	0,32
		1,0	14	22	157,41	0,23	0,41	0,39
44	28. III.	3,0	14	23	155,46	0,40	1,14	1,13
		2,0	14	23	154,47	0,56	1,15	1,07
		1,0	14	22	153,85	0,17	0,47	0,45
45	1. IV.	3,0	11	24	154,83	0,29	1,43	1,40
		4,0	11	25	153,00	1,36	3,17	2,98
46	3. IV.	2,5	10	23	154,60	0,15	1,20	1,13
		4,0	10	24	150,05	0,24	2,52	2,37

Beide Tiere wurden gefüttert: 24. III. bis 28. III.
29. III.
30. III.

Gleichzeitig wurde ein Tier ohne Schilddrüse, welches auch Schilddrüsentabletten erhielt, zum Kontrollversuch herangezogen, beide Tiere erhielten die gleiche Adrenalininjektion. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe finden sich in Tabelle IV.

Zieht man aus beiden Versuchsreihen den Mittelwert der Prozentsteigerung, so ist das Resultat ein außerordentlich schlagendes und beweisendes. Beim Tier, welches während der Schilddrüsenfütterung mit subkutaner Adrenalininjektion behandelt wurde, stieg im Mittel die Kohlensäurebildung um 87,78 Proz., der Sauerstoffverbrauch um 89,21 Proz., die Kalorienbildung um 86,67 Proz., hingegen zeitigte das schilddrüsenlose Tier, welches auch Schilddrüsentabletten erhielt, nur eine prozentische Steigerung der Kohlensäurebildung von 32,79 Proz.,

Ratte (Weibchen), Kontrolltier.

Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Kalorienbildung Cal	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung Proz.	Bemerkungen
während der Schilddrüsenfütterung.							
0,740	2,758	2,707	9,13	—	—	—	Nüchtern
0,773	5,164	4,851	16,46	80,26	87,24	79,20	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,725	4,549	4,549	15,32	67,78	64,94	68,05	
0,711	3,533	3,611	12,11	32,63	28,10	33,40	
0,733	2,896	2,871	9,45	—	—	—	Nüchtern
0,761	5,045	4,814	16,30	72,50	74,21	67,68	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,725	5,792	5,792	19,51	106,48	75,83	101,74	
0,737	3,413	3,363	11,35	—	—	—	Nüchtern
0,742	8,390	8,219	27,73	144,36	145,82	144,40	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,748	3,260	3,165	10,70	—	—	—	
0,764	5,206	4,948	16,76	56,64	59,69	56,34	0,03mg Adrenalin subkutan
Mittelwert der proz. Steigerung				87,78	89,21	86,67	
Schilddrüsenloses Tier. Schilddrüsentablette + Adrenalin.							
0,767	2,375	2,249	7,63	—	—	—	Nüchtern
0,813	2,375	2,121	7,25	−4,98	0	−5,69	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,863	2,411	2,031	7,01	−8,13	1,52	−9,69	
0,764	2,605	2,478	8,39	9,96	9,68	10,18	
0,733	2,444	2,423	8,16	—	—	—	Nüchtern
0,781	3,722	3,463	11,77	44,24	52,29	42,92	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,759	3,055	2,925	9,91	21,45	25,00	18,66	
0,742	3,079	3,014	10,17	—	—	—	Nüchtern
0,773	5,180	4,869	16,52	62,45	68,24	61,55	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,771	3,105	2,924	9,92	—	—	—	
0,772	4,199	3,949	13,40	35,08	35,23	35,06	0,03mg Adrenalin subkutan
Mittelwert der proz. Steigerung				32,79	36,97	32,21	

1 Schilddrüsentablette täglich,
2 " "
1 " " .

des Sauerstoffverbrauchs von 36,97 Proz., der Kalorienbildung von 32,21 Proz. Die Schilddrüsenfütterung des schilddrüsenlosen Tieres hatte zwar den Umsatz infolge Adrenalininjektion gegenüber der Umsatzsteigerung ohne Zufuhr von Schilddrüsenpräparat gesteigert. Nichtsdestoweniger ist der Unterschied gegenüber dem normalen Tiere ein außerordentlich großer. Wiederum zeigt diese Versuchsreihe den großen Einfluß der Schilddrüse auf die Wirksamkeit des Adrenalins.

Die größere Wirkung des Adrenalins bei Tieren mit Schilddrüse und der große Einfluß bei Zufuhr von Schilddrüse auf die Wirksamkeit des Adrenalins ist aus der vorhergehenden Versuchsreihe klar geworden. Es ist jedoch eines Einwandes zu gedenken, welcher gegen die Beweiskraft dieser Versuche erhoben werden könnte. Eine der Folgen der

Tabelle V. 5. Gruppe.

Vers.-suchs-Nr.	Datum	Versuchs-dauer	Zimmer-temperatur	Temperatur im Kasten	Körper-gewicht	H_2O-Bildung	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch
	1924	Stdn.	°C	°C	g	g	g	g
						Die Versuche mit		Adrenalin
1	2. V.	3,0	16	21	148,32	0,63	1,13	1,08
		3,0	16	24	147,03	0,58	1,52	1,47
		1,0	16	24	146,40	0,16	0,51	0,49
2	6. V.	3,0	19	22	154,74	0,83	1,03	0,98
		3,0	18	22	153,13	0,47	1,49	1,39
		1,0	18	23	152,56	0,22	0,51	0 50
3	8. V.	3,0	16	20	151,99	0,42	1,05	1,03
		3,0	16	22	151,00	0,90	1,43	1,34
		1,0	16	22	150,01	0,11	0,37	0,38
4	12. V.	2,5	15	20	153,04	0,28	0,95	0,93
		3,0	16	20	151,77	0,52	1,20	1,11
		1,0	16	20	151,16	0,15	0,39	0,37
5	14. V.	4,5	17	22	149,81	0,41	1,17	1,15
		3,0	17	25	148,17	0,89	1,93	1,80
		1,0	17	25	147,05	0,13	0,40	0,40
6	16. V.	3,0	18	25	153,05	0,25	0,92	0,91
		4,5	18	25	151,68	0,89	1,87	1,87
7	23. V.	2,0	20	23	146,95	0,28	0,57	0,57
		4,0	20	26	146,15	0,70	1,82	1,72
						Die Versuche mit		Pilocarpin
8	19. V.	3,0	20	25	150,73	0,26	1,10	1,08
		4,0	20	25	149,25	0,57	1,45	1,42
9	21. V.	2,5	20	24	146,87	0,50	0,76	0,74
		4,0	20	26	146,65	0,75	1,47	1,42

Exstirpation ist die merkliche Herabsetzung der Permeabilität. Da nun in der vorausgegangenen Versuchsreihe die Adrenalininjektion subkutan ausgeführt worden war, konnte daran gedacht werden, daß es sich nur um eine Resorptionshemmung des Adrenalins aus dem subkutanen Gewebe handelt, nicht aber um eine verminderte Wirksamkeit des Adrenalins auf die Zellstätten, von denen die Größe des respiratorischen Umsatzes abhängt. Aus diesem Grunde habe ich weitere Versuchsreihen angestellt, in denen ich nach *Meltzers* Vorgang das Adrenalin intramuskular injiziert habe, eine Injektionsweise, welche genau so wirkt, wie die intravenöse. Über diese Versuchsreihe orientieren Tabelle V, VI, VII und VIII. Ich habe in diesen Versuchen noch eine Änderung gegenüber der vorher innegehaltenen Methode eingeführt, indem ich die Stunden nach der Injektion variierte, in denen der Ruheumsatz festgestellt werden sollte. Auf diese Weise hoffte ich, genaueren Aufschluß über den zeitlichen Ablauf der Vor-

Weiße Ratte (Weibchen.)

Respirationsquotienten	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Kalorienbildung Cal	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung Proz.	Bemerkungen
vor der Operation.							
0,760	2,536	2,424	8,21	—	—	—	Nüchtern
0,751	3,446	3,333	11,27	35,88	37,50	37,26	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
0,756	3,484	3,347	11,33	37,38	38,08	38,03	
0,764	2,219	2,111	7,15	—	—	—	Nüchtern
0,779	3,243	3,026	10,29	46,15	43,34	43,98	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
0,741	3,343	3,277	11,06	50,65	55,24	54,75	
0,741	2,303	2,259	7,62	—	—	—	Nüchtern
0,775	3,157	2,958	10,02	37,08	30,94	31,41	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
0,707	2,467	2,533	8,50	7,12	12,13	11,48	
0,742	2,483	2,431	8,20	—	—	—	Nüchtern
0,785	2,636	2,438	8,30	6,16	0,29	1,19	0,03mg Adrenalin intramuskulär
0,766	2,580	2,448	8,31	3,91	0,70	1,28	
0,739	1,736	1,706	5,75	—	—	—	Nüchtern
0,779	4,342	4,049	13,73	150,11	137,34	139,29	0,2 mg Adrenalin intramuskulär
0,725	2,720	2,720	9,16	56,68	59,44	59,25	
0,734	2,004	1,982	6,67	—	—	—	Nüchtern
0,725	2,740	2,740	9,23	36,73	38,24	38,38	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
0,725	1,939	1,939	6,53	—	—	—	Nüchtern
0,769	3,113	2,942	9,98	60,55	51,73	52,83	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
vor der Operation.							
0,740	2,433	2,388	8,06	—	—	—	Nüchtern
0,742	2,429	2,379	8,03	— 0,16	— 0,38	— 0,37	1,0 mg Pilocarpin subkutan
0,746	2,070	2,015	6,81	—	—	—	Nüchtern
0,752	2,080	2,010	6,79	0,48	— 0,25	— 0,29	1,0 mg Pilocarpin subkutan

gänge nach der Injektion zu erhalten. Außerdem habe ich in diesen Versuchen noch Pilocarpininjektion, mehr zur Information als zu tiefergehenden Untersuchungen angewandt. Die Zusammenfassung findet sich in den Tabellen IX und X.

Ich werde, da alles sich genau in den Tabellen vorfindet, nur die wesentlichsten Punkte herausheben, die am klarsten dasjenige zeigen, worauf es ankommt. Bei dem einen Versuchstier zeitigte im normalen Zustand die intramuskuläre Injektion von 0,1 mg Adrenalin eine Steigerung der Kohlensäurebildung im Durchschnitt von 50,41 Proz., des Sauerstoffverbrauchs von 45,21 Proz., der Kalorienbildung von 45,85 Proz. Ein Tier zeigte nach Entfernung der Schilddrüse unter den sonst gleichen Bedingungen nur eine Steigerung der Kohlensäurebildung von 8,30 Proz., des Sauerstoffverbrauchs von 7,55 Proz. und der Kalorienbildung von 7,40 Proz.

Tabelle VI. 5. Gruppe.

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Stdn.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g
					Die Versuche mit Adrenalin nach			
10	2. VI.	2,0	19	22	156,78	0,18	0,62	0,62
		3,0	19	24	154,60	0,38	1,05	1,05
		1,0	19	23	154,22	0,13	0,36	0,36
11	4. VI.	3,0	19	23	158,08	0,31	0,89	0,90
		3,0	19	25	157,18	0,33	1,04	1,02
		1,0	19	25	156,83	0,10	0,33	0,33
12	6. VI.	3,0	18	25	155,20	0,32	0,90	0,92
		3,0	18	23	153,05	0,22	0,94	0,94
		1,0	18	23	152,83	0,23	0,42	0,39
13	11. VI.	3,0	18	24	155,16	0,24	0,91	0,89
		3,0	18	25	153,33	0,34	0,96	0,96
		1,0	18	26	153,00	0,28	0,45	0,41
14	13. VI.	3,0	18	26	153,73	0,35	0,91	0,91
		3,0	18	26	152,22	0,35	1,01	1,01
		1,0	18	26	151,82	0,11	0,40	0,41
		1,0	18	26	151,72	0,09	0,42	0,39
15	16. VI.	3,0	18	25	151,73	0,35	0,91	0,86
		4,0	18	26	149,74	0,62	1,33	1,30
		1,0	18	25	149,09	0,21	0,42	0,37
16	18. VI.	2,0	19	23	152,95	0,28	0,69	0,67
		3,0	19	25	150,53	0,34	1,10	1,01
		1,0	19	25	150,10	0,19	0,40	0,38
		2,0	19	25	149,89	0,19	0,66	0,61
17	22. VI.	2,0	17	25	156,65	0,17	0,69	0,66
		3,0	17	24	154,18	0,41	1,15	1,11
		1,0	17	25	153,73	0,09	0,31	0,30
		1,0	17	25	153,63	0,12	0,43	0,42
18	25. VI.	3,0	18	23	155,63	0,40	1,03	0,99
		3,0	18	25	153,64	0,31	1,10	1,03
		1,0	18	25	153,26	0,15	0,40	0,39
19	30. VI.	3,0	19	24	154,11	0,38	0,86	0,86
		3,0	20	26	152,70	0,25	0,90	0,90
		1,0	21	26	152,45	0,15	0,33	0,32
		1,0	21	25	152,29	0,15	0,36	0,35
20	8. VII.	3,0	20	26	155,02	0,37	0,90	0,89
		3,0	20	26	153,38	0,23	0,95	0,97
		1,0	20	25	153,18	0,10	0,32	0,31
		1,0	20	25	153,07	0,13	0,37	0,36
						Die Versuche mit Pilocarpin		
21	20. VI.	2,0	19	25	152,50	0,24	0,63	0,63
		3,0	19	26	152,58	0,30	0,92	0,88
		1,0	19	26	152,24	0,12	0,35	0,35
22	27. VI.	3,0	19	24	153,48	0,32	0,94	0,94
		4,0	19	25	152,47	0,37	1,30	1,28
23	2. VII.	3,0	21	24	152,97	0,45	0,94	0,95
		4,0	21	24	152,97	0,92	1,43	1,35

eiße Ratte (Weibchen).

Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Kalorienbildung Cal.	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung Proz.	Bemerkungen
r Operation. (27. V. operiert).							
0,725	1,977	1,977	6,66	—	—	—	Nüchtern
0,725	2,264	2,264	7,62	14,52	14,52	14,52	0,1 mg Adrenalin
0,725	2,334	2,334	7,86	18,48	18,48	18,48	intramuskulär
0,718	1,877	1,898	6,38	—	—	—	Nüchtern
0,741	2,206	2,163	7,30	17,53	13,96	14,49	0,1 mg Adrenalin
0,725	2,104	2,104	7,09	12,09	10,85	11,09	intramuskulär
0,711	1,933	1,976	6,63	—	—	—	Nüchtern
0,725	2,048	2,048	6,89	5,95	3,64	3,92	0,1 mg Adrenalin
0,782	2,748	2,552	8,68	53,08	29,15	30,93	intramuskulär
0,743	1,955	1,912	6,45	—	—	—	Nüchtern
0,725	2,087	2,087	7,03	6,75	9,15	8,98	0,1 mg Adrenalin
0,797	2,941	2,680	9,14	50,44	40,17	41,70	intramuskulär
0,725	1,973	1,973	6,64	—	—	—	Nüchtern
0,762	2,321	2,212	7,49	17,67	12,11	12,79	0,2 mg Adrenalin
0,709	2,635	2,701	9,06	33,55	36,90	36,42	intramuskulär
0,782	2,768	2,571	8,74	40,29	30,31	31,61	
0,769	1,999	1,889	6,41	—	—	—	Nüchtern
0,743	2,221	2,170	7,32	11,11	14,87	14,20	0,1 mg Adrenalin
0,825	2,817	2,482	8,52	40,92	31,32	32,91	intramuskulär
0,748	2,256	2,190	7,40	—	—	—	Nüchtern
0,791	2,436	2,237	7,62	7,98	2,15	2,97	0,1 mg Adrenalin
0,765	2,665	2,532	8,59	18,13	15,62	16,07	intramuskulär
0,786	2,202	2,035	6,93	− 2,39	− 7,08	− 6,35	
0,759	2,202	2,107	7,14	—	—	—	Nüchtern
0,753	2,486	2,400	8,11	12,90	13,91	13,91	0,2 mg Adrenalin
0,751	2,017	1,952	6,60	− 8,40	− 7,36	− 7,57	intramuskulär
0,744	2,799	2,734	9,22	27,11	29,76	28,49	
0,756	2,206	2,120	7,18	—	—	—	Nüchtern
0,776	2,387	2,234	7,60	8,21	5,42	5,85	0,03mg Adrenalin
0,745	2,610	2,545	8,60	18,31	20,04	19,77	intramuskulär
0,725	1,860	1,860	6,26	—	—	—	Nüchtern
0,725	1,965	1,965	6,62	5,65	5,65	5,65	0,03mg Adrenalin
0,749	2,165	2,099	7,10	16,40	12,85	13,41	intramuskulär
0,747	2,364	2,298	7,77	27,10	23,55	24,11	
0,735	1,935	1,914	6,46	—	—	—	Nüchtern
0,712	2,113	2,108	7,08	9,20	10,14	9,45	0,1 mg Adrenalin
0,750	2,089	2,024	6,84	7,96	5,75	5,89	intramuskulär
0,747	2,417	2,352	7,95	24,91	22,89	23,08	
ch der Operation.							
0,725	2,066	2,066	6,96	—	—	—	
0,759	2,009	1,923	6,51	− 2,76	− 6,92	− 6,47	1,0 mg Pilocarpin
0,725	2,229	2,299	7,74	11,28	11,28	11,28	subkutan
0,725	2,042	2,042	6,87	—	—	—	
0,738	2,132	2,099	7,08	4,41	2,79	3,06	1,0 mg Pilocarpin subkutan
0,719	2,048	2,070	6,96	—	—	—	
0,770	2,337	2,206	7,49	14,12	6,57	7,62	1,0 mg Pilocarpin subkutan

Tabelle VII. 5. Gruppe

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Stdn.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g
						Die Versuche mit Adrenalin		
1	2. V.	3,0	16	24	258,73	0,40	1,39	1,37
		3,0	16	26	254,13	0,85	2,14	2,04
		1,0	16	26	252,18	0,25	0,67	0,64
2	6. V.	3,0	19	25	254,00	0,75	1,38	1,35
		3,0	18	27	249,25	0,95	2,01	1,91
		1,0	18	28	248,20	0,14	0,68	0,65
3	8. V.	3,0	16	25	251,66	0,51	1,29	1,27
		3,0	16	26	246,71	0,49	1,89	1,78
		1,0	16	25	246,16	0,19	0,59	0,53
4	12. V.	2,0	15	23	243,08	0,22	1,18	1,16
		3,0	16	24	237,93	0,84	1,55	1,52
		1,0	16	24	237,06	0,15	0,52	0,51
5	14. V.	4,5	17	24	237,85	0,52	1,51	1,51
		3,0	17	26	233,41	0,92	1,71	1,63
		1,0	17	26	233,03	0,17	0,69	0,67
6	16. V.	3,0	18	25	237,96	0,71	1,34	1,29
		4,5	18	26	234,33	1,41	2,96	2,89
7	6. VI.	2,0	18	23	238,40	0,31	0,82	0,79
		5,0	18	25	235,19	0,91	2,38	2,26
		1,0	18	25	234,16	0,26	0,66	0,62
						Die Versuche mit Pilocarpin		
8	19. V.	3,0	20	25	238,96	0,69	1,21	1,14
		4,0	20	27	234,37	1,00	2,01	1,92
9	21. V.	2,5	20	24	222,05	0,62	0,91	0,88
		4,0	20	26	219,71	1,09	1,76	1,71
10	4. VI.	3,0	19	25	241,56	0,64	1,53	1,51
		4,0	19	25	238,16	0,39	1,89	1,93

Als ich die vierte Stunde hinzunahm, betrug die prozentische Steigerung der Kohlensäurebildung 41,85 Proz., des Sauerstoffverbrauchs 42,86 Proz. und der Kalorienbildung 42,94 Proz. Hingegen war bei dem gleichen Tiere nach Entfernung der Schilddrüse in dieser Zeit die Kohlensäurebildung nur 22,53 Proz., des Sauerstoffverbrauchs 18,55 Proz., der Kalorienbildung 18,79 Proz. Eine Wiederholung dieser Versuchsreihe zeigte einen womöglich noch größeren Unterschied beim Tiere vor und nach der Operation. In einer weiteren Versuchsreihe habe ich 0,2 Proz. Adrenalin intramuskulär injiziert. Am normalen Tiere war in der vierten Stunde nach der Injektion die Erhöhung der Kohlensäurebildung 75,69 Proz., des Sauerstoffverbrauchs 73,77 Proz., der Kalorienbildung 74,38 Proz. Hingegen be-

hwanzgefärbte Ratte (Männchen).

Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Kalorienbildung Cal	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung Proz.	Bemerkungen
r der Operation.							
0,737	1,791	1,765	5,96	—	—	—	Nüchtern
0,762	2,807	2,676	9,07	56,73	51,62	52,17	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,760	2,657	2,538	8,60	48,35	43,80	44,30	
0,743	1,811	1,772	5,98	—	—	—	Nüchtern
0,765	2,688	2,554	8,67	48,43	44,13	44,97	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,760	2,740	2,619	8,90	51,30	47,80	48,36	
0,738	1,709	1,682	5,68	—	—	—	Nüchtern
0,771	2,553	2,405	8,16	49,39	42,99	43,77	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,809	2,397	2,153	7,36	40,26	28,00	29,72	
0,739	1,942	1,909	6,44	—	—	—	Nüchtern
0,741	2,172	2,130	7,19	11,84	11,58	11,63	0,03 mg Adrenalin subkutan
),741	2,194	2,151	7,26	12,98	12,68	12,72	
),725	1,411	1,411	4,75	—	—	—	Nüchtern
),762	2,442	2,328	7,88	74,77	61,32	65,83	0,2 mg Adrenalin subkutan
),748	2,961	2,857	9,72	109,85	103,72	104,44	
),755	1,877	1,807	6,12	—	—	—	Nüchtern
),768	2,807	2,655	9,01	49,55	46,93	47,22	0,1 mg Adrenalin subkutan
),754	1,720	1,657	5,60	—	—	—	Nüchtern
),765	2,024	1,922	6,52	17,68	15,99	16,43	0,1 mg Adrenalin subkutan
),773	2,819	2,648	8,98	63,90	59,81	60,36	
der Operation.							
),771	1,688	1,590	5,41	—	—	—	Nüchtern
),761	2,144	2,048	6,94	27,01	28,81	28,28	1,0 mg Pilocarpin subkutan
),751	1,639	1,585	5,36	—	—	—	Nüchtern
),748	2,003	1,946	6,58	22,21	22,78	22,76	1,0 mg Pilocarpin subkutan
,736	2,111	2,084	7,03	—	—	—	Nüchtern
,711	1,984	2,026	6,80	—6,02	—2,78	—3,27	1,0 mg Pilocarpin subkutan

trugen die Steigerungen der Schilddrüse für die Kohlensäurebildung nur 17,84 Proz., für den Sauerstoffverbrauch 15,55 Proz. und der Kalorienbildung 15,53 Proz. Die Unterschiede sind womöglich noch größer geworden. Einen Versuch habe ich angestellt, wo ich nur 0,03 mg Adrenalin intramuskulär injizierte. Am normalen Tiere betrugen die prozentischen Steigerungen der Kohlensäurebildung 20,16 Proz., für den Sauerstoffverbrauch 14,12 Proz., für die Kalorienbildung 16,07 Proz. und nach der Operation für die Kohlensäurebildung 10,13 Proz., für den Sauerstoffverbrauch 7,80 Proz. und für die Kalorienbildung 7,99 Proz.

Etwas anderes war in dieser Versuchsreihe das Ergebnis der Pilocarpininjektion, ich injizierte 1 mg Pilocarpin subkutan. Die Er-

Tabelle VIII. 5. Gruppe.

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Stdn.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g
					Die Versuche mit Adrenalin nach			
11	16. VI.	3,0	18	22	220,24	0,52	1,28	1,20
		4,0	18	23	214,64	0,83	1,84	1,72
		1,0	18	23	213,69	0,11	0,43	0,43
12	18. VI.	2,0	19	25	221,62	0,44	0,88	0,87
		3,0	19	25	217,02	0,55	1,43	1,30
		1,0	19	25	216,34	0,12	0,44	0,42
		2,0	19	24	216,20	0,27	0,82	0,77
13	20. VI.	2,0	19	25	213,04	0,35	0,77	0,67
		3,0	19	26	208,74	0,96	1,37	1,25
		1,0	19	25	207,66	0,19	0,45	0.40
		1,0	19	26	207,42	0,25	0,50	0,48
14	25. VI.	3,0	18	23	223,27	0,44	1,28	1,19
		3,0	18	22	218,14	0,48	1,44	1,38
		1,0	18	23	217,60	0,15	0,47	0,46
15	30. VI.	3,0	19	25	240,31	0,49	1,26	1,19
		3,0	20	26	237,04	0,65	1,45	1,43
		1,0	21	26	236,37	0,17	0,43	0,39
		1,0	21	26	235,16	0,10	0,45	0.42
16	3. VII.	2,0	20	24	241,75	0,45	0,83	0,79
		3,0	20	26	238,19	0,30	1,77	1,76
		1,0	20	26	237,88	0,18	0,60	0,52
		1,0	20	25	237,62	0,11	0,46	0.46
17	7. VII.	3,0	20	25	248,57	0,52	1,21	1,17
		3,0	20	25	243,59	0,75	1,51	1.46
		1,0	20	25	242,79	0,15	0,49	0,48
		1,0	20	25	242,63	0,14	0,45	0,44
18	9. VII.	3,5	20	25	248,05	0,39	1,39	1,36
		3,0	20	25	242,64	0,03	1,42	1,32
		1,0	20	25	242,51	0,25	0,47	0,47
		1,0	20	25	242,28	0,15	0,46	0,44
19	15. VII.	3,0	22	27	250,58	0,67	1,26	1,21
		3,0	23	26	247,16	0,68	1,64	1,62
		2,0	22	26	246,46	0,30	0,86	0.82
						Die Versuche mit Pilocarp		
20	11. VII.	3,0	20	25	243,77	0,62	1,22	1,17
		4,0	20	25	241,41	0,50	1,97	1,85
21	17. VII.	3,0	21	25	252,46	0,42	1,15	1,11
		4,0	22	26	249,57	0,58	1,93	1,81
22	19. VII.	4,0	20	26	248,46	0,54	1,80	1,73

chwanzgefärbte Ratte (Männchen).

Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Kalorienbildung Cal	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung Proz.	Bemerkungen
er Operation (11. VI. operiert).							
0,775	1,937	1,816	6,15	—	—	—	Nüchtern
0,777	2,143	2,003	6,81	10,63	10,30	10,73	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,725	2,012	2,012	6,78	3,87	10,79	10,24	
0,735	1,985	1,963	6,62	—	—	—	Nüchtern
0,799	2,196	1,997	6,81	10,63	1,73	2,87	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,761	2,034	1,941	6,57	2,47	— 1,12	0,75	
0,774	1,896	1,781	6,04	— 4,48	9,27	8,76	
0,835	1,807	1,573	5,41	—	—	—	Nüchtern
0,796	2,188	1,996	6,81	21,08	26,90	25,90	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,817	2,167	1,926	6,60	19,92	22,45	22,01	
0,757	2,411	2,314	7,84	33,42	47,12	44,95	
0,781	1,911	1,777	6,05	—	—	—	Nüchtern
0,758	2,200	2,109	7,14	15,12	18,69	18,21	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,742	2,160	2,114	7,13	13,03	18,97	18,05	
0,769	1,748	1,651	5,60	—	—	—	Nüchtern
0,737	2,039	2,011	6,78	16,65	21,81	21,07	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,800	1,819	1,650	5,63	4,06	— 0,06	0,54	
0,778	1,914	1,786	6,07	9,50	8,18	8,39	
0,763	1,717	1,634	5,53	—	—	—	Nüchtern
0,731	2,477	2,463	8,29	44,27	50,74	49,88	0,2 mg Adrenalin subkutan
0,838	2,522	2,186	7,52	46,89	33,78	35,96	
0,725	1,936	1,936	6,50	12,76	18,48	17,53	
0,751	1,623	1,569	5,30	—	—	—	Nüchtern
0,751	2,066	1,998	6,75	27,30	27,34	27,34	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,742	2,018	1,977	6,67	24,34	26,00	25,83	
0,743	1,855	1,814	6,12	14,30	15,62	15,46	
0,742	1,601	1,567	5,29	—	—	—	Nüchtern
0,781	1,943	1,806	6,14	21,36	15,26	16,08	0,03mg Adrenalin subkutan
0,725	1,938	2,021	6,80	21,05	28,98	28,57	
0,759	1,899	1,816	6,15	18,61	15,90	16,27	
0,756	1,676	1,610	5,45	—	—	—	Nüchtern
0,735	2,212	2,185	7,37	31,98	35,72	35,22	0,05mg Adrenalin subkutan
0,762	1,745	1,664	5,63	4,12	3,35	3,30	
ch der Operation.							
0,757	1,668	1,600	5,42	—	—	—	Nüchtern
0,774	2,040	1,916	6,50	22,30	19,75	19,93	1,0 mg Pilocarpin subkutan
0,753	1,518	1,466	4,95	—	—	—	Nüchtern
0,775	1,933	1,813	6,16	27,33	23,68	24,42	1,0 mg Pilocarpin subkutan
0,756	1,811	1,741	5,90	—	—	—	1,0 mg Pilocarpin subkutan

Tabelle IX. Die zusammengefaßten Ergebnisse der 5. Gruppe. Weiße Ratte.

Versuchsarten	Vor der Operation: Versuchs-Nr.	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Respirationsquotient	Kalorienbildung Cal	Nach der Operation: Versuchs-Nr.	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Respirationsquotient	Kalorienbildung Cal
Ruheumsatz		—	—	—	—	10	1,977	1,977	0,725	6,66
		—	—	—	—	11	1,877	1,898	0,718	6,38
		—	—	—	—	12	1,933	1,976	0,711	6,63
		—	—	—	—	13	1,955	1,912	0,743	6,45
		—	—	—	—	14	1,973	1,973	0,725	6,41
	1	2,536	2,424	0,760	8,21	15	1,999	1,889	0,769	6,41
	2	2,219	2,111	0,764	7,15	16	2,256	2,190	0,748	7,40
	3	2,303	2,239	0,741	7,62	17	2,202	2,107	0,759	7,14
	4	2,483	2,431	0,742	8,20	18	2,206	2,190	0,748	7,40
	5	1,736	1,706	0,739	5,75	19	1,860	1,860	0,725	7,26
	6	2,004	1,982	0,734	6,67	20	1,935	1,914	0,735	6,46
	7	1,939	1,939	0,725	6,53	21	2,066	2,066	0,725	6,96
	8	2,433	2,388	0,740	8,06	22	2,042	2,042	0,725	6,87
	9	2,070	2,015	0,752	6,81	23	2,048	2,070	0,719	6,96
Mittelwert		2,184	2,139	0,742	7,22		2,024	2,000	0,735	6,76
Erste 3 Stunden nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (intramuskulär)		—	—	—	—	10	2,264	2,264	0,725	7,62
		—	—	—	—	11	2,206	2,163	0,741	7,30
		—	—	—	—	12	2,048	2,048	0,725	7,89
	1	3,446	3,333	0,751	11,27	13	2,087	2,087	0,725	7,03
	2	3,243	3,026	0,779	10,29	16	2,436	2,237	0,791	7,62
	3	3,157	2,958	0,775	10,02	20	2,113	2,108	0,712	7,08
Mittelwert		3,285	3,106	0,768	10,53		2,192	2,151	0,740	7,26
Steigerung in Proz.		50,41	45,21	—	45,85		8,30	7,55	—	7,40
Vierte Stunde nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (intramuskulär)		—	—	—	—	10	2,334	2,334	0,725	7,86
		—	—	—	—	11	2,104	2,104	0,725	7,09
		—	—	—	—	12	2,748	2,552	0,782	8,68
	1	3,484	3,347	0,756	11,33	13	2,941	2,680	0,797	9,14
	2	3,343	3,277	0,741	11,06	16	2,665	2,532	0,765	8,59
	3	2,467	2,533	0,707	8,50	20	2,089	2,024	0,750	6,84
Mittelwert		3,098	3,052	0,737	10,30		2,480	2,371	0,760	8,03
Steigerung in Proz.		[illegible]	[illegible]		[illegible]		[illegible]	[illegible]	—	18,79

						[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Vierte Stunde nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (intramuskulär)		—	—	—	—	11	2,181	2,169	0,730	7,25
	1	3,456	3,337	0,752	11,29	12	2,223	2,174	0,743	7,24
	2	3,268	3,089	0,769	10,48	13	2,301	2,235	0,748	7,57
	3	2,985	2,852	0,760	9,64	15	2,221	2,170	0,744	7,32
	6	2,740	2,740	0,725	9,23	16	2,493	2,311	0,784	7,86
	7	3,113	2,942	0,769	9,98	20	2,232	2,087	0,777	7,02
Mittelwert		3,112	2,992	0,756	10,12		2,276	2,204	0,750	7,45
Steigerung in Proz.		42,49	39,88	—	40,17		12,45	10,20	—	10,21
Fünfte Stunde nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (intramuskulär)		—	—	—	—	15	2,817	2,482	0,825	8,52
		—	—	—	—	20	2,417	2,352	0,747	7,95
Mittelwert		—	—	—	—		2,617	2,417	0,787	8,24
Steigerung in Proz.		—	—	—	—		29,30	20,85	—	21,89
Vier Stunden nach der Injektion von 0,2 mg Adrenalin (intramuskulär)		—	—	—	—	14	2,400	2,334	0,747	7,88
		—	—	—	—	17	2,369	2,288	0,752	7,73
Mittelwert	5	3,937	3,717	0,769	12,79		2,385	2,311	0,750	7,81
Steigerung in Proz.		75,69	73,77	—	74,38		17,84	15,55	—	15,53
Vier Stunden nach der Injektion von 0,03 mg Adrenalin (intramuskulär)		—	—	—	—	18	2,443	2,313	0,767	7,85
		—	—	—	—	19	2,015	1,999	0,732	6,74
Mittelwert	4	2,622	2,441	0,780	8,38		2,229	2,156	0,751	7,30
Steigerung in Proz.		20,06	14,12	—	16,07		10,13	7,80	—	7,99
Vier Stunden nach der Injektion von 1,0 mg Pilocarpin (subkutan)		—	—	—	—	21	2,082	2,017	0,750	6,82
	8	2,429	2,379	0,742	8,03	22	2,132	2,099	0,738	7,08
	9	2,080	2,010	0,752	6,79	23	2,337	2,206	0,770	7,49
Mittelwert		2,255	2,195	0,746	7,41		2,184	2,107	0,753	7,13
Steigerung in Proz.		3,25	2,62		2,63		7,91	5,35		5,47

Tabelle X. Die zusammengefaßten Ergebnisse der 5. Gruppe. Schwanzgefärbte Ratte.

Versuchsarten	Versuchs-Nr.	Vor der Operation: CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	Vor der Operation: O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Vor der Operation: Respirationsquotient	Vor der Operation: Kalorienbildung Cal	Versuchs-Nr.	Nach der Operation: CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	Nach der Operation: O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Nach der Operation: Respirationsquotient	Nach der Operation: Kalorienbildung Cal
Ruheumsatz		—	—	—	—	11	1,937	1,816	0,775	6,15
	1	1,791	1,765	0,737	5,95	12	1,985	1,963	0,735	6,62
	2	1,811	1,772	0,743	5,98	13	1,807	1,573	0,835	5,41
	3	1,709	1,682	0,738	5,68	14	1,911	1,777	0,781	6,04
	4	1,942	1,909	0,739	6,44	15	1,748	1,651	0,769	5,60
	5	1,411	1,411	0,725	4,75	16	1,717	1,634	0,763	5,53
	6	1,877	1,807	0,755	6,12	17	1,623	1,569	0,751	5,30
	7	1,720	1,657	0,754	5,60	18	1,601	1,567	0,742	5,29
	8	1,688	1,590	0,771	5,41	19	1,676	1,610	0,756	5,45
	9	1,639	1,585	0,751	5,36	20	1,668	1,600	0,757	5,42
	10	2,111	2,084	0,736	7,03	21	1,518	1,466	0,753	4,95
Mittelwert		1,770	1,726	0,745	5,83		1,745	1,657	0,765	5,61
Erste 3 Stunden nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)		—	—	—	—	12	2,196	1,997	0,799	6,81
		—	—	—	—	13	2,188	1,996	0,796	6,81
	1	2,807	2,676	0,762	9,07	14	2,200	2,109	0,758	7,14
	2	2,688	2,554	0,765	8,67	15	2,039	2,011	0,737	6,78
	3	2,553	2,405	0,771	8,16	17	2,066	1,998	0,751	6,75
Mittelwert		2,683	2,545	0,766	8,63		2,138	2,022	0,768	6,86
Steigerung in Proz.		51,58	47,45	—	48,03		22,52	22,04	—	22,28
Vierte Stunde nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)		—	—	—	—	12	2,034	1,941	0,761	6,57
		—	—	—	—	13	2,167	1,926	0,817	6,60
	1	2,657	2,538	0,760	8,60	14	2,160	2,114	0,742	7,13
	2	2,740	2,619	0,760	8,90	15	1,819	1,650	0,800	5,63
	3	2,397	2,153	0,809	7,36	17	2,018	1,977	0,742	6,67
Mittelwert		2,598	2,437	0,774	8,29		2,040	1,922	0,771	6,52
Steigerung in Proz.		46,78	41,19	—	42,20		16,91	16,00	—	16,22

Vier Stunden nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)		—	—	—	—	12	2,156	1,983	0,790	6,75
	1	2,770	2,642	0,762	8,95	13	2,183	1,979	0,801	6,76
	2	2,701	2,570	0,764	8,73	14	1,983	1,860	0,775	6,32
	3	2,514	2,342	0,780	7,96	15	1,984	1,920	0,751	6,49
	6	2,807	2,655	0,768	9,01	17	2,054	1,993	0,749	6,73
Mittelwert		2,698	2,542	0,771	8,66		2,084	1,956	0,774	6,64
Steigerung in Proz.		52,43	47,28	—	48,54		19,43	18,06	—	18,36
Fünfte Stunde nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)		—	—	—	—	11	2,012	2,012	0,725	6,76
		—	—	—	—	13	2,411	2,314	0,757	7,84
		—	—	—	—	15	1,914	1,786	0,778	6,07
		—	—	—	—	17	1,855	1,814	0,743	6,12
Mittelwert		—	—	—	—		2,048	1,982	0,751	6,70
Steigerung in Proz.		—	—	—	—		17,36	19,61	—	19,43
Vier Stunden nach der Injektion von 0,2 mg Adrenalin (subkutan)	5	2,572	2,460	0,765	8,34	16	2,488	2,394	0,755	8,10
Steigerung in Proz.		45,31	42,53	—	43,05		42,58	44,51	—	44,39
Vier Stunden nach der Injektion von 0,3 mg Adrenalin (subkutan)	4	2,178	2,135	0,741	7,21	18	1,942	1,860	0,759	6,31
Steigerung in Proz.		23,05	23,81	—	23,67		11,29	12,26	—	12,48
Vier Stunden nach der Injektion von 1,0 mg Pilocarpin (subkutan)	8	2,144	2,048	0,761	6,94	20	2,040	1,916	0,774	6,50
	9	2,003	1,946	0,748	6,58	21	1,933	1,813	0,775	6,16
	10	1,984	2,026	0,711	6,80	22	1,811	1,741	0,756	5,90
Mittelwert		2,044	2,007	0,740	6,77		1,928	1,823	0,752	6,19
Steigerung in Proz.		15,48	16,28	—	16,12		10,25	10,02	—	10,34

höhungen des Grundumsatzes waren 4 Stunden nach der Injektion am normalen Tiere recht gering, der Kohlensäurebildung 3,25 Proz., des Sauerstoffverbrauchs 2,62 Proz., der Kalorienbildung 2,63 Proz. Hingegen betrug nach der Operation die Steigerung der Kohlensäurebildung 7,1 Proz., des Sauerstoffverbrauchs 5,35 Proz. und der Kalorienbildung 5,47 Proz. Hier liegt die Steigerung zugunsten des Tieres ohne Schilddrüse. Aber in dem nächsten Versuch kehrt sich die Sache um, da ist die Erhöhung am normalen Tiere 4 Stunden nach Injektion von 1 mg Pilocarpin für die Kohlensäurebildung 15,48 Proz., für den Sauerstoffverbrauch 16,28 Proz. und die Kalorienbildung 16,12 Proz. Hingegen betrugen nach der Exstirpation der Schilddrüse die Erhöhungen für Kohlensäure 10,25 Proz., für Sauerstoffverbrauch 10,02 Proz. und für die Kalorienbildung 10,34 Proz. In diesen Fällen entsprechen die Ergebnisse dem, was man erwarten würde, wenn die Lehre zutrifft, daß das Fehlen der Schilddrüse das ganze autonome Nervensystem in seiner Einflußfähigkeit herabsetzt. Warum das in den voraufgegangenen Versuchen nicht zum Ausdruck kam, entzieht sich meiner Beurteilung.

Sehr demonstrativ ist schließlich der Versuch an der anderen Ratte, wo nach den ersten 3 Stunden nach Adrenalininjektion am normalen Tiere die Erhöhung der Kohlensäurebildung 51,58 Proz., diejenige des Sauerstoffverbrauchs 47,45 Proz., der Kalorienbildung 48,03 Proz. betrug. Die gleiche Adrenalinmenge erzielte am gleichen Tiere nach der Entfernung der Schilddrüse nur eine Steigerung der Kohlensäurebildung um 16,1 Proz., des Sauerstoffverbrauchs um 16 Proz., der Kalorienbildung um 16,22 Proz. In der vierten Stunde nach Adrenalin betrugen am normalen Tiere die Steigerungen der Kohlensäurebildung 52,43 Proz., des Sauerstoffverbrauchs 47,28 Proz. und der Kalorienbildung 58,54 Proz. Nach Exstirpation der Schilddrüse waren die Erhöhungen nur 19,4 Proz., 18,06 Proz. und 18,36 Proz. Auch in der fünften Stunde nach der Injektion betrug beim schilddrüsenlosen Tiere die Erhöhung der Kohlensäurebildung 17,36 Proz., des Sauerstoffverbrauchs 16,61 Proz., der Kalorienbildung 19,43 Proz. Alle die zuletzt besprochenen Versuche dieser Reihe wurden bei subkutaner Injektion ausgeführt, und sie zeigen keinen Einfluß der Zeit auf das Ergebnis, so daß schon hieraus erfolgt, daß die Unterschiede nicht Unterschiede der Resorptionsgeschwindigkeit, sondern Unterschiede der Anspruchsfähigkeit sind, indem bei intramuskulärer und bei subkutaner Injektion genau die gleichen Unterschiede sich herausstellen.

Wie sehr die Erscheinungen, welche man beobachten kann, von der Dosierung abhängen, das zeigen die beiden anderen Versuche, wo ich einmal 0,2 mg Adrenalin und das andere Mal 0,03 mg Adrenalin

injizierte. Die Wirkung von 0,2 mg ist so stark, daß die Unterschiede sich verwischen. Hingegen werden sie wieder deutlich bei Injektion von 0,03 mg Adrenalin. Eine Übersicht über meine Resultate liefern auch die nachfolgenden kurvenmäßigen Darstellungen.

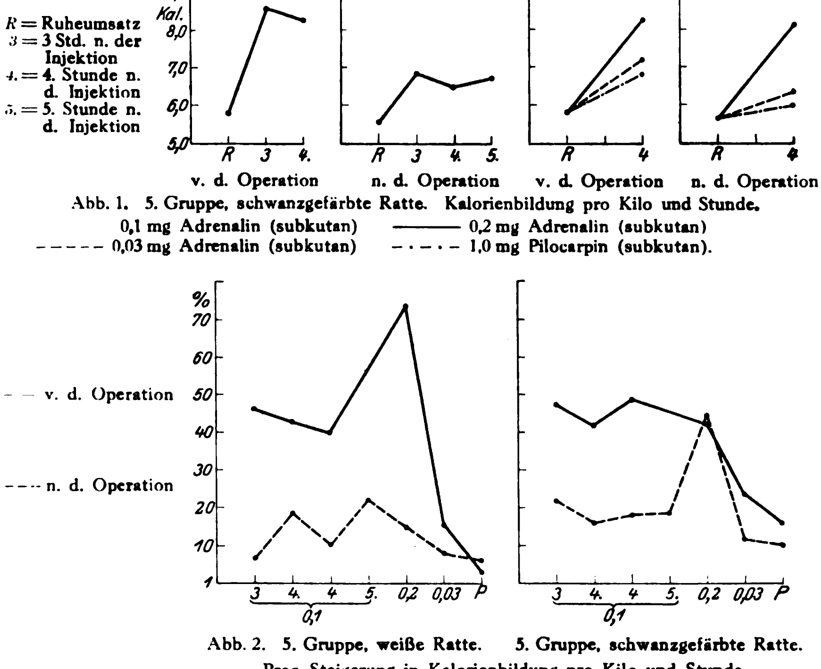


Abb. 1. 5. Gruppe, schwanzgefärbte Ratte. Kalorienbildung pro Kilo und Stunde.
0,1 mg Adrenalin (subkutan) ——— 0,2 mg Adrenalin (subkutan)
- - - - - 0,03 mg Adrenalin (subkutan) – · – · – 1,0 mg Pilocarpin (subkutan).

Abb. 2. 5. Gruppe, weiße Ratte. 5. Gruppe, schwanzgefärbte Ratte.
Proz.-Steigerung in Kalorienbildung pro Kilo und Stunde

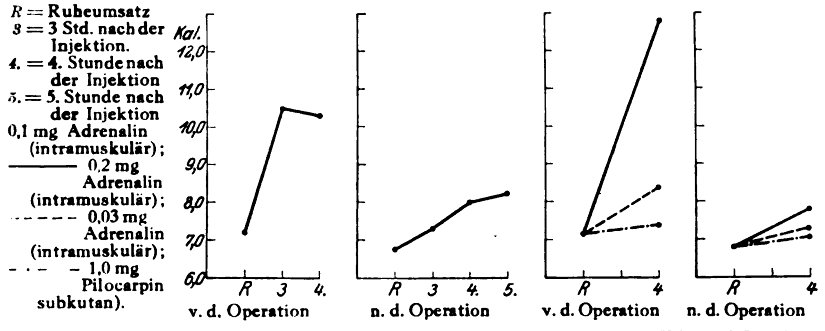


Abb. 3. 5. Gruppe, weiße Ratte. Kalorienbildung pro Kilo und Stunde.

Die Versuche, über welche ich berichtet habe, haben in mannigfach abgeänderter Methodik zeigen können, daß die Wirkungsstärke unter sonst gleichen Bedingungen von der Schilddrüse abhängt. Denn die Entfernung der Schilddrüse bewirkt, daß die Steigerung des Grundumsatzes durch Adrenalininjektion bei Ratten außerordentlich sich

vermindert. Andererseits veranlaßt die Fütterung mit Schilddrüsentabletten eine ungemeine Steigerung der Wirksamkeit von Adrenalin auf den respiratorischen Grundumsatz. Selbst bei Fütterung mit Schilddrüse kommt auch der Unterschied zwischen einem normalen und einem schilddrüsenlosen Tiere zum Ausdruck, indem am schilddrüsenlosen Tiere, welches mit Schilddrüse gefüttert wird, zwar die Steigerung nach Adrenalininjektion größer ist als beim nicht behandelten schilddrüsenlosen Tiere, aber ungleich viel kleiner als beim normalen Tiere. Durch diese Versuche sind neue Beweise für die Lehre erbracht worden, daß die Wirksamkeit des Adrenalins im tierischen Organismus abhängig von der Schilddrüse ist und in einfachster Weise diese Abhängigkeit sich so formulieren läßt, daß das innere Sekret der Schilddrüse die autonomen Endstätten, an denen das Adrenalin angreift, aktiviert. Durch diesen Nachweis werden auch die mit anderen Methoden gewonnenen Erfahrungen von Aktivierung des Adrenalins durch Schilddrüsensekret gestützt, während die Versager, d. h. Nichtgelingen des Nachweises dieser Beziehung, auf Momenten der Versuchsanordnung beruhen müssen. Denn die Ergebnisse der Stoffwechselversuche können nicht durch diejenigen Bedingungen verwischt werden, welche sehr wohl Schwankungen in feineren Reizversuchen zeitigen können.

Zusammengefaßt, sind die Ergebnisse meiner Versuche nachfolgende:

1. Es wurde die Methode des respiratorischen Grundumsatzes herangezogen, um die Beziehungen zwischen der Schilddrüse und Adrenalinwirksamkeit weiter aufzuklären.

2. Bei normalen Ratten steigert die subkutane und intramuskuläre Injektion von Adrenalin den Grundumsatz sehr stark.

3. Nach Entfernung der Schilddrüse bewirken die gleichen Adrenalinmengen eine sehr viel kleinere Erhöhung des Grundumsatzes.

4. Fütterung von Ratten mit Schilddrüsentabletten bewirkt eine außerordentliche Steigerung des Grundumsatzes nach Adrenalininjektion. Diese Steigerung ist auch bemerklich bei Tieren ohne Schilddrüse, aber sie ist geringer, als bei normalen Tieren.

5. Es ließ sich durch genaue zeitliche Versuche beweisen, daß die viel geringere Wirkung von Adrenalin auf die Umsatzsteigerung schilddrüsenloser Tiere nicht auf einer verlangsamten Resorption des Adrenalins beruht.

6. Diese Ergebnisse, gewonnen an sicheren Stoffwechselversuchen, sind neue Stützen für die Lehre, daß das Schilddrüsensekret ein Aktivator des parasympathischen und sympathischen Nervensystems ist, eine Lehre, die nicht dadurch geändert wird, daß die Aktivierung von Adrenalin, wie wohl auch von anderen pharmakologischen Stoffen, durch die Schilddrüse keine streng spezifische ist. Im tierischen Organismus kommt jedenfalls in erster Linie die Schilddrüse in Betracht.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 72.

Untersuchungen über den Einfluß der Nebenniere auf den respiratorischen Grundumsatz.

Von

Kimio Nakayama.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 8. Januar 1925.)

Es besteht wohl ausgesprochen und unausgesprochen die Meinung, daß die Nebenniere einen sehr großen Einfluß auf den Stoffwechsel habe. Ja für gewisse Seiten des Stoffwechsels, insbesondere des Kohlehydratstoffwechsels, scheint man der Nebenniere eine größere Rolle zuschreiben zu wollen, als auf Grund der experimentellen Erfahrungen gestattet ist. Unsere Kenntnisse über den Einfluß der Nebenniere auf den respiratorischen Stoffwechsel sind deshalb so fragmentarisch, abgesehen von einigen bemerkenswerten Ausnahmen, unter anderen den Arbeiten von *Boothby* und *Sandiford*[1]), weil die meisten Tiere die Entfernung nur außerordentlich kurze Zeit überleben. Eine Ausnahme macht bekanntlich die Ratte, welche schon mehrfach im Berner physiologischen Institut zur Untersuchung der Nebennierenfunktion gedient hat und deren Heranziehung zu Aufschlüssen über die Funktion der Nebenniere geführt hat, die man mit anderen Versuchstieren nicht erhalten könnte. Ich erinnere an die Reproduktion eines Kardinalsymptoms des Morbus Addison, welche *Asher* und *Mauerhofer* gelungen ist[2]), sowie an den Nachweis von giftigen Stoffen in der Muskulatur nebennierenloser Tiere durch *Asher* und *Erni*[3]).

---

[1]) *Boothby* and *Sandiford*, Amer. Journ. of Physiol. **50**, 463. 1922.
[2]) *Mauerhofer*, Zeitschr. f. Biol. **74**, 147, 1922.
[3]) *M. Erni*, ebendaselbst **78**, 315, 1923.

Auf Anregung von Prof. *Asher* habe ich mit den bekannten Methoden des Berner physiologischen Instituts Untersuchungen über den respiratorischen Grundumsatz nebennierenloser Ratten, die ich vorher auf ihren normalen Grundumsatz hin geprüft habe, angestellt. Ferner habe ich vergleichend die normalen und die nebennierenlosen Ratten durch verschiedene Eingriffe stoffwechselphysiologischer Natur beeinflußt, insbesondere solche, welche den Kohlehydratstoffwechsel betreffen.

Alle zum Versuch dienenden Ratten habe ich mit Brot und Milch gefüttert und vor dem Versuch über 16 Stunden hungern lassen. Nach der von *Takahashi* beschriebenen Kontrollmethode von *Asher*[1]) habe ich stets Kontrolltiere im Parallelversuch stehen gehabt, und zwar wurden die Kontroll- und die Versuchstiere in gleicher Zeit und mit gleicher Dauer unter genau gleichen Bedingungen untersucht.

Bei den Zuckerversuchen wurden die Ratten nach Einführung der Zuckerlösung mit Hilfe einer in die Mundhöhle eingeführten Kanüle sofort in den Kasten gesetzt und meistens stundenweise untersucht. Die gewogenen Zuckermengen wurden in 3 bis 4 ccm warmen Wassers gelöst.

Zuerst habe ich die normalen Tiere untersucht, dann nach einseitiger Nebennierenexstirpation, sodann nach zweiseitiger Nebennierenexstirpation.

Um die Berechnung meiner Versuche unter Benutzung der Kontrollmethode (gleichzeitige Untersuchung eines Kontrolltieres) klarzumachen, bringe ich folgende Ausführungen über die Berechnungen der prozentischen Steigerung.

1. Die prozentische Steigerung des Ruheumsatzes nach der einseitigen und doppelseitigen Entfernung der Nebennieren werden mit dem Ruheumsatz vor der Operation verglichen.

2. Die prozentische Steigerung in den Versuchen mit Rohrzucker und Lävulose wird mit dem Ruheumsatz nach der doppelseitigen Exstirpation vergleichend ausgerechnet.

(—)-Zeichen in der prozentischen Steigerung bedeutet Verminderung.

Bei dem Kontrolltiere sind die Zahlen, welche in Klammern gesetzt sind, unter der Berücksichtigung von den Kontrollresultaten ausgerechnet. Während einer langen Versuchszeit sinkt der Ruheumsatz immer allmählich ab, besonders in dem ersten bis zweiten Monat am deutlichsten. Demnach habe ich wie nachfolgend berechnet:

$$\begin{array}{c}\text{Ruheumsatz v. d. Operation}\\ \text{(Versuchstier)}\end{array} \times \frac{\begin{array}{c}\text{Ruheumsatz (Kontrolle n. d. r.}\\ \text{Nebennierenexstirpation)}\\ \text{(Kontrolltier)}\end{array}}{\begin{array}{c}\text{Ruheumsatz (Kontrolle v. d. Ope-}\\ \text{ration) (Kontrolltier)}\end{array}} = \begin{array}{c}\text{Ruheumsatz n. d. r. Neben-}\\ \text{nierenexstirpation (Versuchs-}\\ \text{tier) (mit Klammer)}\end{array}$$

$$\frac{\begin{array}{c}\text{Ruheumsatz n. d. r. Nebennieren-}\\ \text{exstirpation (ohne Klammer)}\\ \text{(Versuchstier)}\end{array} \times \begin{array}{c}\text{Ruheumsatz n. d. r. Nebennieren-}\\ \text{exstirpation (mit Klammer)}\\ \text{(Versuchstier)}\end{array}}{\text{Ruheumsatz n. d. r. Nebennierenexstirpation (mit Klammer)}} \times 100 = \begin{array}{c}\text{Proz. Steigerung}\\ \text{n. d. r. Neben-}\\ \text{nierenexstirpat.}\\ \text{(mit Klammer)}\end{array}$$

[1]) *Y. Takahashi*, diese Zeitschr. **145**, 130, 1924.

z. B.

$$2{,}294 \cdot \frac{1{,}944}{2{,}373} = (1{,}879)$$

$$\frac{(2{,}331 - 1{,}879) \, . \, 100}{1{,}879} = (24{,}06 \text{ Proz.}) \text{ (1. Gruppe. Rückengefärbte Ratte).}$$

$$\begin{array}{c}\text{Ruheumsatz v. d. Operation}\\\text{(Versuchstier)}\end{array} \times \frac{\begin{array}{c}\text{Ruheumsatz (Kontrolle n. d.}\\\text{doppelseitigen Exstirpation) (Kon-}\\\text{trolltier)}\end{array}}{\begin{array}{c}\text{Ruheumsatz v. d. Operation}\\\text{(Kontrolltier)}\end{array}} = \begin{array}{c}\text{Ruheumsatz n. d. doppel-}\\\text{seitigen Exstirpation (mit}\\\text{Klammer) (Versuchstier)}\end{array}$$

$$\frac{\begin{array}{c}\text{Ruheumsatz n. d. Exstirpation}\\\text{(ohne Klammer) (Versuchstier)}\end{array} \times \begin{array}{c}\text{Ruheumsatz n. d. doppelseitigen}\\\text{Exstirpation (mit Klammer)}\\\text{(Versuchstier)}\end{array}}{\begin{array}{c}\text{Ruheumsatz n. d. doppelseitigen Exstirpation (mit Klammer)}\\\text{(Versuchstier)}\end{array}} \times 100 = \begin{array}{c}\text{Proz. Steigerung}\\\text{n. d. doppelseit.}\\\text{Exstirpation}\\\text{(Versuchstier)}\\\text{(mit Klammer)}\end{array}$$

z. B.

$$2{,}294 \cdot \frac{1{,}817}{2{,}373} = (1{,}757)$$

$$\frac{1{,}957 - 1{,}757}{1{,}757} \cdot 100 = (11{,}38) \text{ Proz. (1. Gruppe. Rückengefärbte Ratte).}$$

Tabelle I gibt die Werte beim Kontrolltier, und zwar den Ruheumsatz während der Zeit, wo das eigentliche Tier nicht operiert wird, sodann den Ruheumsatz in der Periode, in welcher beim Versuchstier die Untersuchungen nach doppelseitiger Entfernung angestellt wurden, und schließlich die Periode, in welcher das Versuchstier nach doppelseitiger Exstirpation Rohrzucker erhielt. In dieser Periode erhielt auch das Kontrolltier vor jedem Versuch 3 g Rohrzucker. In Tabelle II bringe ich die Versuche am Versuchstier, welches den schon gesagten Versuchseingriffen unterzogen wurde.

In Tabelle III bringe ich die Ergebnisse der Versuche an einem neuen Kontrolltier, wo außer den schon gesagten Versuchseingriffen noch die Zufuhr von Lävulose (Präparat von *Merck*) untersucht wurde. Zum Verständnis wiederhole ich, daß dieses Kontrolltier natürlich stets im Besitz seiner Nebennieren war, aber gleichzeitig mit dem nebennierenlosen Tiere mit der gleichen Versuchsanordnung in einer gleichgestalteten Respirationskammer untersucht wurde.

In Tabelle IV teile ich die Versuche mit, welche an einem dieser Tiere angestellt wurden, welches der Nebennierenexstirpation unterzogen wurde.

In Tabelle V werden die Versuchsergebnisse an einer weiteren Ratte mitgeteilt, welche gleichfalls der Nebennierenexstirpation unterzogen wurde.

Tabellen VI und VII bringen die Zusammenfassung über sämtliche Versuche.

Aus der zusammenfassenden Übersicht ergibt sich, daß infolge der doppelseitigen Entfernung der Nebennieren der Ruheumsatz entweder sinken kann oder nur um ein Geringes sich vermindert. Namentlich dann, wenn man die operierten Tiere mit den gleichzeitig untersuchten

Tabelle I. 1. Gruppe.

Versuchs-Nr.	Datum 1923—1924	Versuchsdauer Std.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g
Ruheumsatz vor							
1	24. X.	3,5	18	23	148,95	0,84	1,15
2	26. X.	3,0	19	24	152,99	0,95	1,11
3	29. X.	3,0	18	23	160,90	0,59	1,51
4	31. X.	3,0	17	24	159,01	0,29	1,16
5	1. XI.	3,0	17	23	153,14	0,56	1,26
6	3. XI.	3,0	17	23	155,35	0,57	1,14
7	6. XI.	3,0	18	24	161,41	0,38	1,10
8	8. XI.	3,0	17	24	151,79	0,31	1,14
9	9. XI.	3,0	17	24	167,63	0,29	1,06
10	13. XI.	3,0	16	22	160,02	0,38	1,24
11	17. XI.	3,0	18	23	164,94	0,67	1,05
12	20. XI.	2,5	17	25	169,34	0,37	0,88
13	21. XI.	3,0	17	25	166,98	0,53	1,06
Kontrolle des Ruheumsatzes nach dem							
14	26. XI.	3,0	17	24	178,75	0,55	1,01
15	29. XI.	3,0	17	23	179,63	0,76	1,11
16	1. XII.	3,0	17	26	181,37	0,49	1,28
17	4. XII.	3,0	17	23	186,72	0,33	0,99
18	5. XII.	3,0	17	23	186,77	0,48	1,07
19	6. XII.	2,5	17	24	188,21	0,37	0,89
20	7. XII.	3,0	17	25	181,60	0,43	1,00
21	8. XII.	3,0	16	23	182,12	0,45	1,05
22	10. XII.	3,0	17	23	187,00	0,43	1,05
Kontrolle des Ruheumsatzes nach							
23	13. XII.	3,0	18	24	193,30	0,53	1,05
24	14. XII.	3,0	17	24	192,67	0,55	1,03
25	15. XII.	3,0	17	24	191,60	0,60	1,01
26	17. XII.	3,0	18	26	186,70	0,61	1,06
27	18. XII.	3,0	17	24	190,15	0,37	1,04
28	19. XII.	3,0	18	24	187,77	0,55	1,03
29	21. XII.	3,0	18	25	197,85	0,51	1,10
30	22. XII.	3,0	17	24	187,28	0,35	1,00
Kontrolle des Rohrzuckerversuches nach							
31	17. I.	1,0	17	25	247,83	0,24	0,51
		1,0	17	25	247,53	0,26	0,52
32	23. I.	2,0	17	23	149,48	0,37	0,91
		1,0	17	23	249,11	0,24	0,47
33	30. I.	3,0	15	25	251,05	0,65	1,36
		2,5	18	26	250,05	0,42	1,16
34	1. II.	3,0	18	26	245,46	0,80	1,48
35	5. II.	3,0	16	24	259,65	0,44	1,19

opfgefärbte Ratte (Männchen).

O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Mittelwert des Respirationsquotienten	Mittelwert der CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	Mittelwert des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde g	Bemerkungen
er Operation.							
1,09	0,767	2,206	2,091				
1,06	0,761	2,417	2,308				
1,49	0,736	3,126	2,065				
1,09	0,773	2,431	2,285				
1,22	0,750	2,743	2,656				
1,10	0,753	2,446	2,360				
1,07	0,747	2,272	2,210	0,745	2,373	2,313	Nüchtern
1,11	0,746	2,504	2,438				
1,02	0,755	2,107	2,028				
1,19	0,757	2,583	2,479				
1,00	0,763	2,122	2,021				
0,86	0,743	2,079	2,031				
1,04	0,740	2,116	2,076				
ntfernung der linken Nebenniere.							
0,96	0,764	1,884	1,750				
1,07	0,754	2,060	1,986				
1,22	0,762	2,353	2,242				
1,00	0,719	1,767	1,785				
1,06	0,733	1,910	1,892	0,757	1,944	1,866	Nüchtern
0,83	0,779	1,892	1,764				
0,96	0,757	1,836	1,762				
1,00	0,763	1,922	1,830				
1,00	0,763	1,872	1,783				
r doppelseitigen Entfernung der Nebennieren.							
1,02	0,748	1,811	1,759				
0,95	0,788	1,782	1,644				
0,92	0,798	1,757	1,601				
1,06	0,725	1,893	1,893	0,769	1,817	1,717	Nüchtern
0,96	0,787	1,823	1,683				
1,03	0,725	1,829	1,829				
1,01	0,791	1,860	1,709				
0,91	0,798	1,780	1,620				
r doppelseitigen Entfernung der Nebennieren.							
0,45	0,823	2,058	1,816				
0,45	0,839	2,101	1,818				
0,91	0,725	1,824	1,824				
0,45	0,759	1,887	1,806	0,837	1,884	1,635	Vor jedem Versuche 3,0 g Rohrzucker gegeben (per os)
1,11	0,890	1,806	1,474				
0,83	0,806	1,856	1,328				
1,33	0,808	2,010	1,806				
0,94	0,920	1,528	1,207				

Tabelle II. 1. Gruppe.

Versuchs-Nr.	Datum 1923—1924	Versuchsdauer Std.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g
					Ruheumsatz vor		
1	24. X.	3,5	18	23	193,66	0,56	1,54
2	26. X.	3,0	15	24	192,28	0,68	1,45
3	29. X.	3,0	18	24	196,45	0,36	1,50
4	31. X.	3,0	18	25	190,27	0,30	1,36
5	1. XI.	3,0	17	24	182,76	0,34	1,29
6	3. XI.	3,0	17	24	199,23	0,22	1,33
7	6. XI.	3,0	18	25	187,80	0,37	1,05
8	8. XI.	3,0	17	24	191,93	0,20	1,34
9	9. XI.	3,0	17	24	188,51	0,28	1,35
10	13. XI.	3,0	16	23	199,15	0,26	1,46
11	17. XI.	3,0	18	25	198,34	0,46	1,35
12	20. XI.	2,5	17	25	197,93	0,17	1,01
13	21. XI.	3,0	17	26	194,81	0,38	1,29
					Ruheumsatz nach der En		
14	28. XI.	3,0	17	26	198,57	0,49	1,62
15	29. XI.	3,0	17	24	194,52	0,47	1,54
16	1. XII.	3,0	17	26	192,20	0,52	1,12
17	4. XII.	3,0	17	25	193,44	0,34	1,32
18	5. XII.	3,0	17	25	188,07	0,33	1,19
19	6. XII.	2,5	17	25	187,80	0,25	1,11
20	7. XII.	3,0	17	25	184,77	0,32	1,22
21	8. XII.	3,0	16	25	183,33	0,57	1,33
22	10. XII.	3,0	17	26	187,51	0,27	1,30
					Ruheumsatz nach der dopp		
23	13. XII.	3,0	18	25	175,58	0,52	0,98
24	14. XII.	3,0	17	25	178,85	0,34	0,93
25	15. XII.	3,0	16	26	181,94	0,41	0,94
26	17. XII.	3,0	17	25	185,52	0,87	1,00
27	18. XII.	3,0	17	26	188,20	0,26	0,91
28	19 XII.	3,0	18	25	186,74	0,39	1,02
29	21. XII.	3,0	17	25	188,33	0,20	0,98
30	22. XII.	3,0	18	26	189,83	0,38	1,03
					Rohrzuckerversuch nach de		
31	17. I.	1,0	17	25	263,58	0,14	0,52
		1,0	17	26	263,35	0,12	0,52
32	23. I.	2,0	17	25	267,71	0,44	0,99
		1,0	17	25	267,11	0,22	0,52
33	30. I.	3,0	16	26	268,28	0,32	1,37
		2,5	18	25	267,55	0,58	1,18
34	1. II.	3,0	18	25	262,03	0,89	1,36
35	5. II.	3,0	16	26	272,18	0,30	1,42

Rückengefärbte Ratte (Männchen).

O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Mittelwert des Respirationsquotienten	Mittelwert der CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	Mittelwert des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde g	Bemerkungen
der Operation.							
1,44	0,777	2,272	2,125				
1,40	0,752	2,511	2,424				
1,49	0,731	2,544	2,527				
1,28	0,772	2,383	2,242				
1,24	0,756	2,353	2,262				
1,28	0,755	2,225	2,142				
0,99	0,770	1,864	1,757	0,760	2,294	2,193	Nüchtern
1,24	0,785	2,327	2,154				
1,28	0,766	2,387	2,263				
1,39	0,763	2,444	2,327				
1,28	0,766	2,270	2,152				
0,99	0,741	2,041	2,001				
1,25	0,750	2,207	2,139				
rnung der linken Nebenniere.							
1,49	0,790	2,719	2,501				Am 23. XI. linke Nebenniere entfernt
1,35	0,829	2,639	2,313				
1,06	0,768	1,942	1,838				
1,22	0,786	2,275	2,102				
1,15	0,752	2,109	2,038	0,786	2,331	2,155	Nüchtern
1,03	0,783	2,364	2,194				
1,16	0,764	2,204	2,093				
1,23	0,786	2,416	2,236				
1,17	0,807	2,311	2,080				
itigen Nebennierenentfernung.							
0,93	0,766	1,830	1,737				Am 11. XII. rechte Nebenniere entfernt
0,88	0,768	1,733	1,840				
0,91	0,750	1,722	1,667				
0,95	0,765	1,797	1,707				
0,87	0,760	1,612	1,534	0,845	1,957	1,682	Nüchtern
0,97	0,764	1,821	1,732				
0,91	0,780	1,735	1,611				
1,04	0,719	1,809	1,826				
oppelseitigen Nebennierenentfernung.							
0,43	0,879	1,973	1,631				
0,43	0,879	1,975	1,633				
0,83	0,867	1,849	1,550				
0,43	0,879	1,947	1,610				
1,09	0,913	1,702	1,354	0,898	1,835	1,485	Vor jedem Versuch 3,0 g Rohrzucker gegeben (per os)
0,84	0,997	1,764	1,256				
1,19	0,830	1,730	1,514				
1,09	0,946	1,739	1,335				

Tabelle III. 4. Gruppe.

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Std.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g
					Ruheumsatz vor der		
1	4. I.	3,0	14	24	118,36	0,14	0,75
2	7. I.	2,5	14	24	118,23	0,25	0,84
3	9. I.	3,0	16	26	123,89	0,16	0,85
4	11. I.	2,5	16	25	128,42	0,28	0,79
5	12. I.	3,0	16	25	130,79	0,28	0,94
6	14. I.	3,0	16	25	127,80	0,33	0,95
7	16. I.	3,0	16	24	135,05	0,29	0,97
8	17. I.	3,0	18	26	134,21	0,48	0,95
9	18. I.	3,0	16	25	130,50	0,44	0,90
10	19. I.	3,0	18	24	133,05	0,45	0,93
11	21. I.	3,5	16	25	133,09	0,38	0,80
12	25. I.	3,5	17	24	249,05	0,76	1,49
					Ruheumsatz nach der Entfernung		
13	1. II.	3,0	18	26	157,22	0,24	1,04
14	2. II.	2,5	17	26	156,34	0,35	0,83
15	5. II.	3,5	16	25	154,31	0,40	1,13
16	6. II.	3,5	16	24	153,40	0,45	1,10
17	7. II.	3,5	19	26	148,44	0,32	1,06
					Ruheumsatz nach der Entfernung		
18	11. II.	3,0	17	24	149,20	0,34	0,90
19	12. II.	3,0	17	24	149,85	0,39	0,92
20	13. II.	3,0	18	26	145,11	0,30	0,88
21	15. II.	3,0	17	25	149,78	0,29	0,87
22	18. II.	3,0	18	26	148,60	0,51	0,88
23	20. II.	3,0	17	24	151,85	0,68	0,90
24	21. II.	3,0	17	24	150,77	0,60	0,92
25	23. II.	3,0	16	25	156,46	0,34	0,98
26	6. III.	3,0	17	23	152,00	0,28	0,82
27	8. III.	3,0	14	23	151,78	0,35	0,89
28	21. III.	3,0	13	23	157,50	0,27	1,05
29	22. III.	3,0	14	23	157,20	0,29	1,00
30	24. III.	2,5	13	23	153,53	0,27	0,81
					Die Versuche mit Rohrzucker nach		
31	28. II.	1,0	17	26	157,55	0,12	0,40
		1,0	17	25	157,33	0,16	0,51
		1,0	17	26	157,02	0,13	0,48
32	1. III.	2,5	17	25	156,38	0,34	0,85
33	3. III.	1,0	15	21	155,81	0,12	0,44
		1,0	14	22	155,56	0,14	0,53
		1,0	14	23	155,28	0,14	0,52
34	5. III.	4,0	13	22	159,30	0,70	1,70
					Die Versuche mit Lävulose nach der		
35	11. III.	1,0	17	25	158,77	0,13	0,34
		2,0	18	26	158,61	0,22	0,67
		1,0	18	26	158,29	0,17	0,43

Schwarze Ratte (Männchen).

O_2-Verbrauch g	Respirations-quotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Mittelwert des Respirations-quotienten	Mittelwert der CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	Mittelwert des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde g	Bemerkungen
...peration (Kontrolle).							
0,75	0,725	2,112	2,112				
0,79	0,772	2,842	2,673				
0,80	0,772	2,287	2,153				
0,72	0,797	2,461	2,243				
0,84	0,813	2,396	2,141				
0,93	0,742	2,478	2,426	0,769	2,377	2,245	Nüchtern
0,93	0,758	2,394	2,295				
0,92	0,750	2,360	2,285				
0,82	0,797	2,299	2,095				
0,89	0,759	2,330	2,230				
0,75	0,775	2,404	2,254				
1,36	0,796	1,709	1,560				
...er linken Nebenniere (Kontrolle).							
0,98	0,771	2,205	2,078				
0,75	0,804	2,124	1,919				
1,08	0,760	2,092	2,000	0,776	2,102	1,968	Nüchtern
1,02	0,783	2,049	1,900				
1,01	0,762	2,040	1,944				
...eider Nebennieren (Kontrolle).							
0,98	0,734	2,212	2,190				
0,89	0,751	2,047	1,980				
0,88	0,725	2,022	2,022				
0,84	0,752	1,936	1,869				
0,84	0,761	1,974	1,884				
0,86	0,760	1,976	1,888				
0,83	0,805	2,034	1,835	0,758	2,053	1,976	Nüchtern
0,94	0,765	2,109	2,003				
0,87	0,743	1,952	1,908				
0,82	0,788	1,955	1,801				
1,03	0,748	2,244	2,180				
0,94	0,773	2,120	1,993				
0,78	0,754	2,110	2,032				
...er Nebennierenentfernung (Kontrolle).							
0,30	0,969	2,539	1,904				3,0 g Rohrzucker
0,36	1,029	3,242	2,288				
0,36	0,969	3,057	2,293				
0,74	0,834	2,174	1,893	0,965	2,908	2,189	2,0 g „
0,31	1,031	2,824	1,990				2,0 g „
0,39	0,987	3,407	2,507				
0,42	0,899	3,349	2,705				
1,23	1,004	2,668	1,930				2,0 g „
...bennierenentfernung (Kontrolle).							
0,31	0,797	2,142	1,953				
0,57	0,854	2,112	1,797				
0,34	0,919	2,717	2,148				

Tabelle III

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Verruchsdauer Std.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g
36	12. III.	1,0	15	23	160,02	0,18	0,41
		1,0	15	24	159,76	0,22	0,43
		1,0	15	25	159,45	0,16	0,43
		1,0	15	24	159,20	0,14	0,51
37	14. III.	1,0	14	23	164,81	0,13	0,42
		1,0	14	23	164,65	0,18	0,38
		1,0	14	23	164,40	0,12	0,42
		1,0	14	23	164,21	0,22	0,51
38	17. III.	1,0	15	22	161,66	0,15	0,53
		1,0	15	25	161,47	0,12	0,43
		1,0	15	25	161,31	0,12	0,43
		1,0	14	24	161,13	0,15	0,45
39	19. III.	1,0	14	21	169,06	0,13	0,41
		1,0	14	23	168,87	0,15	0,39
		1,0	14	23	168,65	0,19	0,48
		1,5	14	23	168,43	0,17	0,53

Tabelle IV. 4. Gruppe

					Ruheumsatz vor		
1	4. I.	3,0	14	24	238,73	0,41	1,22
2	7. I.	2,5	14	23	233,10	0,41	1,13
3	9. I.	3,0	16	24	248,80	0,39	1,11
4	11. I.	2,5	16	25	248,34	0,31	0,95
5	12. I.	3,0	16	25	247,51	0,56	1,19
6	14. I.	3,0	16	25	246,30	0,73	1,17
7	16. I.	3,0	16	24	252,65	0,75	1,11
8	17. I.	3,0	18	25	242,28	0,59	1,12
9	18. I.	3,0	16	24	245,37	0,56	1,16
10	19. I.	3,0	16	24	240,85	0,58	1,15
11	21. I.	2,5	16	25	245,57	0,37	0,99
12	25. I.	3,5	17	24	249,05	0,76	1,49
					Ruheumsatz nach der		Entfernung
13	1. II.	3,0	18	24	224,58	0,70	1,19
14	2. II.	2,5	16	27	220,79	0,45	1,02
15	5. II.	3,5	16	24	248,33	0,62	1,70
16	6. II.	3,5	16	24	239,51	0,55	1,57
17	7. II.	3,5	15	24	229,42	0,80	1,28
					Ruheumsatz nach der		Entfernung
18	11. II.	3,0	17	23	230,54	0,46	1,08
19	12. II.	3,0	17	23	225,69	0,42	1,05
20	13. II.	3,0	18	25	222,84	0,47	1,10
21	15. II.	3,0	17	24	230,11	0,40	1,06
22	18. II.	3,0	18	25	228,89	0,74	1,07
23	20. II.	3,0	17	23	242,53	1,02	1,20
24	21. II.	3,0	17	24	235,05	0,59	1,22
25	23. II.	3,0	16	23	231,90	0,40	1,09
26	6. III.	3,0	14	21	215,26	0,62	1,16
27	8. III.	3,0	14	20	221,34	0,48	1,15
28	21. III.	3,0	13	19	238,03	0,50	1,38
29	22. III.	3,0	14	20	236,62	0,47	1,42

(Fortsetzung).

O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Mittelwert des Respirationsquotienten	Mittelwert der CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	Mittelwert des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde g	Bemerkungen
0,33	0,903	2,562	2,062				
0,34	0,919	2,692	2,128				
0,34	0,919	2,697	2,132				
0,40	0,926	3,204	2,513				
0,39	0,782	2,548	2,366				
0,31	0,890	2,308	1,883				
0,35	0,872	2,555	2,129	0,785	2,617	2,210	Vor jedem Versuch 3,0 g Lävulose (*Merck*) gegeben (per os)
0,43	0,862	3,106	2,619				
0,49	0,786	3,279	3,031				
0,39	0,801	2,663	2,415				
0,36	0,868	2,666	2,232				
0,37	0,884	2,793	2,296				
0,35	0,851	2,425	2,070				
0,32	0,875	2,310	1,895				
0,45	0,775	2,846	2,668				
0,42	0,917	2,098	1,662				
Weiße Ratte (Männchen).							
der **Operation.**							
1,14	0,777	1,704	1,592				
1,09	0,753	1,939	1,870				
1,01	0,798	1,487	1,353				
0,88	0,768	1,498	1,416				
1,14	0,758	1,603	1,535				
1,15	0,739	1,584	1,556				
1,06	0,761	1,465	1,399	0,769	1,612	1,522	Nüchtern
1,09	0,746	1,541	1,500				
1,07	0,788	1,576	1,454				
1,08	0,774	1,592	1,495				
0,94	0,765	1,650	1,531				
1,36	0,796	1,709	1,560				
ler **linken** Nebenniere.							
1,15	0,752	1,766	1,707				Am 29. I. linke Nebenniere entfernt
0,92	0,805	1,848	1,667				
1,58	0,782	1,956	1,818	0,774	1,807	1,695	Nüchtern
1,48	0,771	1,873	1,766				
1,22	0,762	1,594	1,519				
»eider **Nebennieren.**							
1,06	0,740	1,562	1,533				Am 8. II. rechte Nebenniere entfernt
1,02	0,748	1,551	1,507				
1,09	0,733	1,645	1,631				
1,09	0,706	1,536	1,579				
1,06	0,733	1,558	1,544				
1,10	0,792	1,650	1,548	0,747	1,697	1,633	Nüchtern
1,15	0,771	1,730	1,631				
1,10	0,720	1,567	1,581				
1,13	0,746	1,798	1,750				
1,09	0,766	1,616	1,532				
1,32	0,759	1,933	1,849				
1,36	0,758	2,000	1,916				

Tabelle IV

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Std.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g
					Die Versuche mit Rohrzucker		
30	28. II.	1,0	17	25	226,78	0,20	0,42
		1,0	17	24	226,56	0,14	0,43
		1,0	17	24	226,36	0,13	0,48
31	1. III.	2,5	17	23	226,14	0,48	1,14
32	3. III.	1,0	15	20	217,57	0,16	0,56
		1,0	14	20	217,28	0,13	0,52
		1,0	14	20	217,04	0,19	0,49
33	5. III.	4,0	13	20	228,21	0,83	2,27
					Die Versuche mit Lävulose		
34	11. III.	1,0	17	23	231,22	0,21	0,40
		2,0	18	24	230,97	0,39	0,89
		1,0	18	24	230,44	0,16	0,54
35	12. III.	1,0	15	20	230,94	0,35	0,51
		1,0	15	20	230,46	0,23	0,51
		1,0	15	22	230,11	0,30	0,41
		1,0	15	21	229,69	0,31	0,59
36	14. III.	1,0	14	22	250,45	0,30	0,53
		1,0	14	22	250,01	0,19	0,57
		1,0	14	22	249,71	0,22	0,48
		1,0	14	22	249,35	0,28	0,57
37	17. III.	1,0	16	22	246,45	0,39	0,59
		1,0	15	23	246,02	0,20	0,60
		1,0	15	22	245,78	0,25	0,58
		1,0	14	23	245,49	0,16	0,56
38	19. III.	1,0	14	22	238,36	0,25	0,48
		1,0	14	23	238,04	0,27	0,54
		1,0	14	23	238,71	0,16	0,54
		1,5	14	23	238,49	0,32	0,48

Tabelle V. 4. Gruppe.

Ruheumsatz v

1	4. I.	3,0	14	24	220,63	0,10	1,08
2	7. I.	2,5	14	23	212,72	0,17	1,24
3	9. I.	3,0	16	26	211,39	0,30	1,37
4	11. I.	2,5	16	25	216,88	0,22	1,16
5	12. I.	3,0	16	25	213,16	0,23	1,30
6	14. I.	3,0	16	25	212,22	0,37	1,55
7	16. I.	3,0	16	24	218,17	0,34	1,52
8	17. I.	3,0	17	25	212,80	0,24	1,31
9	18. I.	3,0	16	25	216,05	0,34	1,52
10	19. I.	3,0	16	24	212,34	0,39	1,45
11	21. I.	2,5	16	25	211,88	0,24	1,25
12	25. I.	3,5	17	24	245,27	0,46	1,80

Fortsetzung).

O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Mittelwert des Respirationsquotienten	Mittelwert der CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	Mittelwert des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde g	Bemerkungen
ach der Nebennierenentfernung.							
0,40	0,763	1,852	1,764				3,0 g Rohrzucker
0,37	0,844	1,898	1,633				
0,39	0,894	2,121	1,723				
0,86	0,963	2,017	1,521	0,908	2,201	1,760	
0,43	0,946	2,574	1,976				2,0 g "
0,41	0,921	2,393	1,887				2,0 g "
0,41	0,868	2,258	1,889				
1,53	1,078	2,498	1,684				2,0 g "
ach der Nebennierenentfernung.							
0,36	0,807	1,730	1,557				
0,75	0,892	1,927	1,624				
0,45	0,872	2,343	1,953				
0,38	0,975	2,208	1,646				
0,39	0,950	2,213	1,692				
0,29	1,027	1,782	1,260				
0,47	0,912	2,569	2,046				
0,39	0,987	2,116	1,557				
0,46	0,900	2,280	1,840				
0,34	1,026	1,922	1,362	0,875	2,197	1,824	Vor jedem Versuch 3,0 g Lävulose (*Merck*) gegeben (per os)
0,46	0,900	2,286	1,845				
0,55	0,779	2,394	2,232				
0,56	0,778	2,439	2,277				
0,54	0,780	2,360	2,197				
0,47	0,866	2,281	1,915				
0,41	0,850	2,014	1,720				
0,48	0,817	2,269	2,017				
0,48	0,817	2,262	2,011				
0,68	0,897	2,348	1,901				
Rückengefärbte Ratte (Männchen).							
er Operation.							
1,08	0,725	1,632	1,632				
1,22	0,738	2,332	2,294				
1,32	0,754	2,160	2,130				
1,12	0,752	2,130	2,066				
1,24	0,761	2,033	1,939				
1,52	0,741	2,434	2,387	0,750	2,181	2,113	Nüchtern'
1,44	0,767	2,322	2,200				
1,32	0,721	2,052	2,068				
1,40	0,789	2,345	2,160				
1,44	0,732	2,276	2,261				
1,16	0,783	2,360	2,190				
1,74	0,751	2,097	2,027				

Tabelle V

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Std.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-bildung g	CO_2-Bildung g
					Ruheumsatz nach der Entfernung		
13	1. II.	3,0	16	25	207,48	0,39	1,26
14	2. II.	2,5	17	25	198,60	0,25	1,05
15	5. II.	3,5	16	25	207,20	0,39	1,74
16	6. II.	3,5	16	25	202,54	0,38	1,49
17	7. II.	3,5	19	26	202,51	0,41	1,15
					Ruheumsatz nach der Entfernung		
18	11. II.	3,0	17	25	206,85	0,50	1,34
19	12. II.	3,0	17	26	202,56	0,36	1,37
20	13. II.	3,0	18	26	208,97	0,37	1,30
21	15. II.	3,0	17	26	206,19	0,22	1,35
22	18. II.	3,0	18	26	202,20	0,49	1,22
23	20. II.	3,0	17	25	215,17	0,63	1,56
24	21. II.	3,0	17	25	206,57	0,47	1,42
25	23. II.	3,0	16	24	209,13	0,24	1,54
26	6. III.	3,0	14	23	220,37	0,17	1,31
27	8. III.	3,0	14	24	223,52	0,58	1,48
28	21. III.	3,0	13	23	231,45	0,50	1,10
29	22. III.	3,0	14	23	231,40	0,20	1,57
30	24. III.	2,5	13	23	227,40	0,24	1,31
					Die Versuche mit Rohrzucker		
31	28. II.	1,0	17	25	219,62	0,16	0,62
		1,0	17	25	219,33	0,11	0,60
		1,0	17	24	219,11	0,09	0,60
32	1. III.	2,5	17	25	224,09	0,29	1,50
33	3. III.	1,0	15	22	213,86	0,01	0,78
		1,0	14	23	213,60	0,07	0,63
		1,0	14	23	213,41	0,17	0,61
34	5. III.	4,0	13	23	228,25	0,54	2,72
					Die Versuche mit Lävulose		
35	11. III.	1,0	17	25	227,31	0,23	0,57
		2,0	18	26	227,00	0,23	1,07
		1,0	18	26	226,60	0,14	0,57
36	12. III.	1,0	15	23	225,09	0,24	0,53
		1,0	15	24	224,84	0,10	0,57
		1,0	15	25	224,58	0,21	0,54
		1,0	15	25	224,26	0,18	0,58
37	14. III.	1,0	14	22	224,85	0,27	0,45
		1,0	14	23	224,55	0,12	0,48
		1,0	14	23	224,33	0,16	0,51
		1,0	14	23	224,16	0,19	0,48
38	17. III.	1,0	15	23	222,94	0,21	0,40
		1,0	15	24	222,68	0,16	0,41
		1,0	15	24	222,48	0,12	0,46
		1,0	14	23	222,30	0,15	0,44
39	19. III.	1,0	14	23	229,57	0,08	0,44
		1,0	14	24	219,41	0,10	0,51
		1,0	14	24	229,22	0,10	0,52
		1,5	14	24	229,02	0,22	0,69

Fortsetzung).

O_2-Verbrauch g	Respirations-quotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Mittelwert des Respirations-quotienten	Mittelwert der CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	Mittelwert des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde g	Bemerkungen
der linken Nebenniere.							
1,17	0,782	2,024	1,880				
0,91	0,838	2,115	1,833				Am 29. I. linke Nebenniere entfernt
1,60	0,790	2,399	2,258	0,784	2,053	1,903	
1,36	0,796	2,102	1,919				Nüchtern
1,15	0,725	1,623	6,623				
beider Nebennieren.							
1,34	0,725	2,159	2,159				Am 8. II. rechte Nebenniere entfernt
1,33	0,748	2,255	2,189				
1,25	0,756	2,074	1,994				
1,25	0,785	2,183	2,021				
1,18	0,751	2,011	1,945				
1,44	0,787	2,417	2,231				
1,37	0,753	2,291	2,211	0,750	2,167	2,113	Nüchtern
1,44	0,761	2,455	2,343				
1,28	0,743	1,980	1,934				
1,35	0,796	2,202	2,013				
1,02	0,783	1,584	1,469				
1,43	0,798	2,262	2,060				
1,31	0,725	2,304	2,304				
nach der Nebennierenentfernung.							
0,49	0,919	2,823	2,231				3,0 g Rohrzucker
0,49	0,890	2,736	2,234				
0,44	0,991	2,741	2,008				
1,40	0,956	2,678	2,035				2,0 g „
0,53	1,069	3,647	2,478	0,759	2,926	2,216	2,0 g „
0,51	0,897	2,949	2,386				
0,49	0,904	2,858	2,296				
1,88	1,051	2,979	2,059				2,0 g „
nach der Nebennierenentfernung.							
0,49	0,845	2,508	2,156				
0,90	0,864	2,356	1,983				
0,48	0,863	2,515	2,118				
0,42	0,917	2,355	1,866				
0,42	0,986	2,535	1,868				
0,43	0,912	2,405	1,915				
0,42	1,003	2,586	1,873				
0,40	0,781	1,912	1,779				
0,38	0,918	2,138	1,692				
0,44	0,842	2,273	1,961	0,928	2,202	1,804	Vor jedem Versuch 3,0 g Lävulose (*Merck*) gegeben (per os)
0,35	0,996	2,141	1,561				
0,35	0,830	1,794	1,570				
0,37	0,805	1,841	1,662				
0,40	0,835	2,068	1,798				
0,39	0,820	1,979	1,754				
0,36	0,888	1,917	1,569				
0,42	0,882	2,223	1,831				
0,42	0,899	2,269	1,832				
0,51	0,983	2,009	1,485				

Tabelle VI. Gesamte Ergebnisse.

Ratte	Versuchsarten	CO_2-Bildung pro kg und Std. g	O_2-Verbrauch pro kg und Std. g	Respirationsquotient	Kalorienbildung Cal	Proz. Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Std.	Proz. Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Std.	Proz. Steigerung der Kalorienbildung	Bemerkungen
1. Gruppe. Kopfgefärbte Ratte (Kontrolltier)	Ruheumsatz (Kontrolle vor der Operation)	2,373	2,313	0,745	7,82				Nüchtern
	„ (Kontr. n. d. r. Epinephrektomie)	1,944	1,866	0,757	6,32	— 18,08	— 19,33	— 19,19	„
	„ (Kontr. n. d. b. Epinephrektomie)	1,817	1,717	0,769	5,83	— 23,43	— 25,77	— 25,45	„
	Versuche mit Rohrzucker	1,884	1,635	0,837	5,62	3,69	4,78	— 3,60	3,0 g Rohrzucker
1. Gruppe. Rückengefärbte Ratte	Ruheumsatz vor der Operation	2,294	2,193	0,760	7,43				Nüchtern
	„ n. d. r. Epinephrektomie	2,331	2,155	0,786	7,34	1,61	— 1,73	— 1,21	„
		(1,879)	(1,769)	(0,772)	(6,00)	(24,06)	(21,82)	(22,32)	
	„ n. d. b. Epinephrektomie	1,957	1,682	0,845	5,79	— 14,69	— 23,30	— 22,08	„
		(1,757)	(1,628)	(0,784)	(5,53)	(11,38)	(3,32)	(4,70)	
	Versuche mit Rohrzucker	1,835	1,485	0,898	5,16	— 6,23	— 11,71	— 10,87	3,0 g Rohrzucker
4. Gruppe. Schwarze Ratte (Kontrolltier)	Ruheumsatz (Kontrolle vor der Operation)	2,377	2,245	0,769	8,16				Nüchtern
	„ (Kontr. n. d. r. Epinephrektomie)	2,102	1,968	0,776	6,69	— 11,57	— 12,34	— 18,01	„
	„ (Kontr. n. d. b. Epinephrektomie)	2,053	1,967	0,758	6,66	— 13,63	— 15,59	— 18,38	„
	Versuche mit Rohrzucker	2,908	2,189	0,965	7,71	41,65	11,29	15,76	0,2—0,3 g Rohrz.
	Versuche mit Lävulose	2,617	2,210	0,785	7,53	27,47	12,35	13,06	3,0 g Lävulose
4. Gruppe. Weiße Ratte	Ruheumsatz vor der Operation	1,612	1,522	0,769	5,17				Nüchtern
	„ n. d. r. Epinephrektomie	1,807	1,695	0,774	5,75	12,10	11,37	11,23	„
		(1,426)	(1,334)	(0,777)	(4,54)	(26,72)	(27,06)	(26,68)	
	„ n. d. b. Epinephrektomie	1,679	1,633	0,747	5,65	4,16	7,29	9,29	„
		(1,392)	(1,334)	(0,758)	(4,52)	(20,62)	(22,41)	(25,01)	
	Versuche mit Rohrzucker	2,201	1,760	0,908	6,13	31,09	7,78	8,70	2,0—3,0 g Rohrz.
	Versuche mit Lävulose	2,197	1,824	0,875	6,32	30,85	11,70	11,86	3,0 g Lävulose
4. Gruppe. Rückengefärbte Ratte	Ruheumsatz vor der Operation	2,181	2,113	0,750	7,14				Nüchtern
	„ n. d. r. Epinephrektomie	2,053	1,903	0,784	6,47	— 5,87	— 9,94	— 9,38	„
		(1,929)	(1,852)	(0,757)	(5,27)	(6,43)	(2,75)	(3,19)	
	„ n. d. b. Epinephrektomie	2,167	2,113	0,750	7,14	— 0,64	— 1,73	— 1,96	„
		(1,884)	(1,851)	(0,757)	(6,27)	(16,02)	(11,67)	(12,01)	
	Versuche mit Rohrzucker	2,026	2,216	0,959	7,79	35,03	7,21	11,29	2,0—2,3 g Rohrz.
	Versuche mit Lävulose	2,202	1,804	0,928	6,31	1,61	— 12,72	— 9,86	3,0 g Lävulose

Tabelle VII.

Stundenverlauf nach der Lävuloseaufnahme (Mittelwert der Versuche 35 bis 39, Tabelle III, IV, V).

Ratte	CO_2-Bildung pro kg und Std. g	O_2-Verbrauch pro kg und Std. g	Respirationsquotient	Kalorienbildung Cal	Bemerkungen	
4. Gruppe.	2,592	2,296	0,820	7,84	1. Stunde	
Schwarze Ratte (Kontrolle)	2,417	2,024	0,848	6,97	2. „	nach der
	2,575	2,192	0,853	7,55	3. „	3,0 g-Lävuloseaufnahme
	2,784	2,248	0,900	7,82	4. „	
4. Gruppe.	2,092	1,742	0,872	6,02	1. Stunde	
Weiße Ratte (nebennierelos)	2,226	1,890	0,856	6,52	2. „	nach der
	2,051	1,691	0,881	5,86	3. „	3,0 g-Lävuloseaufnahme
	2,365	1,932	0,889	6,70	4. „	
4. Gruppe.	2,097	1,788	0,852	6,16	1. Stunde	
Rückengefärbte Ratte	2,219	1,807	0,849	6,54	2. „	nach der
(nebennierelos)	2,274	1,898	0,870	6,56	3. „	3,0 g-Lävuloseaufnahme
	2,246	1,758	0,928	6,15	4. „	

Tabelle VIII. 4. Gruppe. Schwarze

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Std.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g
							Die Versuche	
40	25. III.	3,0	13	24	152,51	0,40	1,09	1,04
		1,0	13	23	154,17	0,13	0,40	0,34
		1,0	13	24	133,98	0,16	0,41	0,37
		1,0	13	24	153,78	0,13	0,45	0,40
		1,0	13	24	153,60	0,16	0,47	0,38
41	27. III.	3,0	13	23	151,43	0,22	0,96	0,93
		1,0	13	23	153,02	0,13	0,44	0,37
		1,0	14	24	152,82	0,14	0,40	0,37
		1,0	14	22	152,65	0,18	0,48	0,43
		1,0	14	23	152,42	0,09	0,36	0,30
Die Versuche mit Lävulose nach d. Schilddrüsenfütterung. 29. bis 30. III. 1 Schild								
42	31. III.	3,0	12	24	155,85	0,29	1,32	1,28
		1,0	12	24	156,70	0,15	0,48	0,45
		1,0	12	24	156,52	0,11	0,51	0,45
		1,0	12	24	156,35	0,16	0,54	0,47
		1,0	12	24	156,12	0,15	0,51	0,42
43	2. IV.	2,5	11	24	150,08	0,24	1,25	1,24
		1,0	11	22	152,10	0,08	0,58	0,56
		1,0	12	24	152,00	0,09	0,60	0,54
		1,0	11	24	151,85	0,10	0,60	0,57
		1,0	11	24	151,68	0,08	0,62	0,53

4. Gruppe. Weiße Ratte (Männchen). Ohne

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Std.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g
							Die Versuche	
39	25. III.	3,0	13	22	238,89	0,69	1,44	1,29
		1,0	13	22	238,62	0,18	0,63	0,52
		1,0	13	23	238,33	0,23	0,60	0,51
		1,0	13	23	238,01	0,23	0,58	0,52
		1,0	13	22	237,72	0,22	0,56	0,46
40	27. III.	3,0	13	20	224,01	0,53	1,43	1,42
		1,0	13	20	226,06	0,21	0,57	0,55
		1,0	14	21	225,83	0,20	0,59	0,51
		1,0	14	22	225,55	0,32	0,59	0,56
		1,0	14	22	225,20	0,17	0,51	0,40
Die Versuche mit Lävulose nach d. Schilddrüsenfütterung. 29. bis 30. III. 1 Schil								
41	31. III.	3,0	12	23	235,86	0,60	1,71	1,65
		1,0	12	21	237,29	0,28	0,71	0,68
		1,0	12	23	236,98	0,21	0,68	0,60
		1,0	12	23	236,69	0,18	0,69	0,63
		1,0	12	23	236,45	0,17	0,70	0,58
42	2. IV.	2,5	11	23	223,29	0,50	1,59	1,56
		1,0	11	21	224,86	0,22	0,75	0,70
		1,0	11	21	224,59	0,15	0,73	0,62
		1,0	11	21	224,30	0,15	0,71	0,62
		1,0	11	21	224,06	0,15	0,69	0,55

Ratte (Männchen), Kontrolltier.

Respirations-quotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Kalorien-bildung Cal	Proz. Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde	Proz. Steigerung des O_2-brauchs pro kg und Stunde	Proz. Steigerung der Kalorien-bildung	Bemerkungen
nit Lävulose.							
0,761	2,382	2,273	7,70				Nüchtern
0,855	2,594	2,205	7,61	8,90	— 2,99	— 1,17	2,0 g Lävulose
0,825	2,663	2,403	8,25	11,80	5,72	7,15	
0,817	2,926	2,601	8,91	22,84	14,43	15,72	
0,898	3,060	2,474	8,60	28,46	8,84	11,69	
0,750	2,113	2,047	6,92				Nüchtern
0,864	2,875	2,418	8,34	36,06	18,12	20,52	2,0 g Lävulose
0,785	2,618	2,421	8,25	23,90	18,27	19,22	
0,811	3,144	2,817	9,63	48,79	37,62	39,17	
0,872	2,360	1,967	6,80	11,69	— 3,96	— 1,73	
rüsentablette täglich (per os). 31. III. 2 Schilddrüsentabletten täglich (per os).							
0,749	2,823	2,732	9,24				Nüchtern
0,775	3,063	2,872	9,76	8,52	5,12	5,63	2,0 g Lävulose
0,823	3,258	2,875	9,85	15,41	5,23	6,61	
0,835	3,454	3,006	10,34	22,35	10,03	11,91	
0,882	3,244	2,690	9,32	14,91	— 1,53	0,87	
0,732	3,332	3,305	11,13				Nüchtern
0,752	3,813	3,682	12,45	14,44	11,41	11,86	2,0 g Lävulose
0,807	3,947	3,553	12,15	18,46	7,50	9,17	
0,765	3,951	3,754	12,74	18,58	13,59	14,47	
0,850	4,088	3,494	12,04	22,69	5,72	8,18	
childdrüsenfütterung, nebennierenloses Tier.							
nit Lävulose.							
0,811	2,009	1,800	6,15				Nüchtern
0,880	2,640	2,179	7,55	31,41	21,06	22,75	3,0 g Lävulose
0,855	2,518	2,140	7,39	25,34	18,89	20,15	
0,810	2,473	2,185	7,47	23,10	21,39	21,45	
0,884	2,356	1,935	6,70	17,27	7,50	8,94	
0,732	2,127	2,113	7,12				Nüchtern
0,753	2,522	2,433	8,22	18,57	15,14	15,46	3,0 g Lävulose
0,784	2,613	2,258	7,68	22,85	6,86	7,87	
0,765	2,616	2,483	8,43	22,99	17,51	18,41	
0,926	2,265	1,776	6,21	6,95	— 15,95	— 12,79	
üsentablette täglich (per os). 31. III. 2 Schilddrüsentabletten täglich (per os)							
0,753	2,417	2,332	7,88				Nüchtern
0,758	2,992	2,866	9,71	23,79	22,90	23,22	3,0 g Lävulose
0,823	2,869	2,532	8,67	18,70	8,58	10,02	
0,796	2,915	2,662	9,08	20,60	14,15	15,22	
0,877	2,961	2,453	8,50	22,51	5,19	7,87	
0,740	2,848	2,795	9,43				Nüchtern
0,778	3,335	3,113	10,58	17,10	11,38	12,20	3,0 g Lävulose
0,780	3,250	2,261	7,69	14,12	— 19,11	— 18,88	
0,832	3,165	2,764	9,49	11,13	— 11,09	0,63	
0,911	3,080	2,455	8,55	8,15	— 12,17	— 9,33	

Tabelle VIII (Fortsetzung). 4. Gruppe. Rückengefärbte Ratte

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Std.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-bildung g	CO_2-bildung g	O_2-Verbrauch g
							Die Versuche	
40	25. III.	3,0	13	23	228,36	0,27	1,64	1,52
		1,0	13	21	227,97	0,11	0,67	0,60
		1,0	13	23	228,50	0,10	0,62	0,54
		1,0	13	23	228,32	0,10	0,60	0,53
		1,0	13	23	228,15	0,14	0,65	0,51
41	27. III.	3,0	13	23	228,72	0,27	1,60	1,52
		1,0	13	23	229,77	0,17	0,65	0,57
		1,0	14	23	229,52	0,15	0,61	0,55
		1,0	14	24	229,31	0,14	0,58	0,54
		1,0	14	24	229,13	0,14	0,60	0,51
						Die Versuche mit Lävulose		
			29. bis	30. III. 1	Schilddrüsentablette täglich (per os)			
42	31. III.	3,0	12	24	229,77	0,47	2,01	1,96
		1,0	12	23	231,32	0,09	0,69	0,65
		1,0	12	24	231,19	0,12	0,91	0,78
		1,0	12	24	230,94	0,09	0,75	0,66
		1,0	12	24	230,76	0,21	0,79	0,79
43	2. IV.	2,5	11	24	218,64	0,22	2,06	2,02
		1,0	11	21	220,43	0,09	0,79	0,76
		1,0	11	24	220,31	0,10	0,86	0,63
		1,0	11	24	220,18	0,09	0,92	0,85
		1,0	11	24	220,04	0,09	0,98	0,89

Kontrolltieren vergleicht, können die Änderungen infolge der doppelseitigen Entfernung der Nebennieren recht unerhebliche sein, sie können aber auch merklich werden.

Was nun die Anspruchsfähigkeit der Tiere auf Rohrzucker und auf Lävulose anbetrifft, so sind die Unterschiede zwischen den normalen und den doppelseitig nebennierenlosen Tieren keine sehr ins Gewicht fallenden. Die Reaktion, welche beide Gruppen von Tieren auf die Zufuhr von Rohrzucker und Lävulose zeigen, ist annähernd dieselbe. Die Unterschiede fallen kaum in Betracht. Die Ergebnisse dieser Versuche erscheinen mir deshalb beachtenswert, weil sie dagegen sprechen, daß das Vorhandensein der Nebennieren für die normale Regulation des Kohlehydratstoffwechsels eine unerläßliche Bedingung sei. Um diesen für die Stoffwechselphysiologie wichtigen Punkt etwas näher aufzuklären, habe ich besondere Versuche angestellt, wo Stunde für Stunde der respiratorische Grundumsatz nach Zufuhr von Lävulose untersucht wurde.

Männchen). Ohne Schilddrüsenfütterung (nebennierenlos).

Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Kalorienbildung Cal	Proz. Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde	Proz. Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde	Proz. Steigerung der Kalorienbildung	Bemerkungen
mit Lävulose.							
0,784	2,394	2,219	7,54				Nüchtern
0,811	2,939	2,632	9,00	22,77	18,61	19,35	3,0 g Lävulose
0,834	2,713	2,363	8,11	13,33	6,49	7,56	
0,822	2,628	2,321	7,95	9,77	4,60	5,44	
0,926	2,849	2,235	7,81	19,01	0,72	3,58	
0,765	2,332	2,215	7,52				Nüchtern
0,828	2,829	2,480	8,51	21,31	11,96	13,17	3,0 g Lävulose
0,863	2,658	2,396	8,27	13,98	8,17	9,98	
0,780	2,529	2,355	8,01	8,41	6,32	6,52	
0,855	2,619	2,226	7,68	12,31	0,50	2,13	
nach der Schilddrüsenfütterung.							
31. III. 2 Schilddrüsentabletten täglich (per os).							
0,745	2,916	2,843	9,61				Nüchtern
0,771	2,983	2,810	9,53	2,30	— 1,16	— 0,83	3,0 g Lävulose
0,848	3,936	3,374	11,62	0,69	18,68	20,92	
0,826	3,248	2,858	9,81	11,39	0,53	2,08	
0,725	3,424	3,424	11,53	17,42	20,44	19,98	
0,741	3,769	3,696	12,47				Nüchtern
0,755	3,584	3,448	11,68	— 4,91	— 6,71	— 6,34	3,0 g Lävulose
0,992	3,904	2,860	10,11	3,58	— 22,62	— 18,93	
0,786	4,178	3,861	13,15	10,85	4,46	5,45	
0,800	4,454	4,045	13,80	18,18	9,44	10,67	

In Tabelle VII gebe ich die Mittelwerte aus meinen zahlreichen Versuchen, die sich in den Tabellen III, IV und V finden. Der Vergleich zwischen dem normalen Kontrolltier und den beiden nebennierenlosen Ratten zeigt folgendes. Sowohl bei den normalen Tieren wie bei den nebennierenlosen Tieren steigt bis zur vierten Stunde der respiratorische Quotient an und ist in der vierten Stunde maximal, woraus folgt, daß in der vierten Stunde die größte Verbrennung der eingeführten Lävulose stattfindet. Insofern besteht zwischen den normalen und den nebennierenlosen Tieren kein Unterschied. Was nun die Größe der Kohlensäurebildung und des Sauerstoffverbrauchs Stunde für Stunde anbetrifft bzw. die Größe der Kalorienbildung, so ist der Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den nebennierenlosen Tieren kein sehr erheblicher. Unterschiede sind zwar da, aber diese Unterschiede erscheinen mir nicht wesentlich. Auch aus dieser Versuchsreihe geht hervor, daß das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein der Nebenniere der Ratten keinen wesentlichen Unterschied für den Ablauf des Kohlehydratstoffwechsels ausmacht.

Tabelle IX.

Zusammenfassende Ergebnisse von Tabelle VIII.

Ratte	Ohne Schilddrüsenfütterung						Nach der Schilddrüsenfütterung						Bemerkungen
	CO_2-Bildung pro kg und Std. g	O_2-Verbrauch pro kg und Std. g	Kalorienbildung Cal	Proz. Steigerung der CO_2-bildung pro kg und Std.	Proz. Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Std.	Proz. Steigerung der Kalorienbildung	CO_2-Bildung pro kg und Std. g	O_2-Verbrauch pro kg und Std. g	Kalorienbildung Cal	Proz. Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Std.	Proz. Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Std.	Proz. Steigerung der Kalorienbildung	
4. Gruppe. Schwarze Ratte (Kontr.-Ratte)	2,248	2,160	7,31				3,078	3,019	10,19				Ruheumsatz
	2,735	2,312	7,98	21,66	7,04	9,17	3,438	3,279	11,11	11,70	8,55	9,03	1. Std. nach 3,0 g Lävulose-aufnahme
	2,641	2,412	8,25	17,48	11,67	12,86	3,601	3,214	11,00	16,99	6,46	7,95	2. Std.
	3,035	2,709	9,27	35,01	25,42	26,81	3,703	3,380	11,54	20,31	11,96	13,25	3. Std.
	2,710	2,221	7,70	20,55	2,82	5,34	3,666	3,092	10,58	19,10	2,42	4,81	4. Std.
	2,780	2,414	8,30	23,67	11,76	18,54	3,602	3,241	11,08	17,02	7,35	8,78	Mittelwert von 4 Stunden
4. Gruppe. Weiße Ratte (nebennierenlos)	2,068	1,957	6,64				2,633	2,564	8,66				Ruheumsatz
	2,581	2,306	7,89	24,81	17,83	18,83	3,164	2,990	10,15	20,17	16,32	17,21	1. Std. nach 3,0 g Lävulose-aufnahme
	2,566	2,199	7,54	24,08	12,37	13,55	3,060	2,397	8,18	16,22	— 8,51	— 5,54	2. Std.
	2,545	2,334	7,95	23,11	19,26	19,73	3,040	2,713	9,26	15,46	5,81	7,28	3. Std.
	2,311	1,856	6,45	11,75	— 5,16	— 2,86	3,021	2,454	8,53	14,74	— 4,29	— 1,50	4. Std.
	2,501	2,174	7,46	20,94	11,09	12,85	3,071	2,639	9,04	18,54	3,38	5,05	Mittelwert von 4 Stunden
4. Gruppe. Rückengefärbte Ratte (nebennierenlos)	2,363	2,217	7,53				3,343	3,270	11,04				Ruheumsatz
	2,884	2,556	8,76	22,05	15,29	16,34	3,284	3,129	10,61	— 1,77	— 4,31	— 3,89	1. Std. nach 3,0 g Lävulose-aufnahme
	2,686	2,380	8,19	13,67	7,35	8,76	3,920	3,117	10,87	17,26	— 4,68	— 1,54	2. Std.
	2,579	2,338	7,98	9,14	5,46	5,98	3,762	3,360	11,98	12,56	2,75	8,51	3. Std.
	2,734	2,231	7,75	15,70	0,63	2,92	3,939	3,735	12,67	17,83	14,22	14,77	4. Std.
	2,721	2,376	8,17	13,60	6,20	7,89	3,727	3,335	11,53	11,49	1,99	4,44	Mittelwert von 4 Stunden

In einer nächsten Versuchsreihe habe ich Kontrolltiere und nebennierenlose Tiere gleichzeitig mit Schilddrüsentabletten gefüttert und den Einfluß von Lävulosezufuhr auf den respiratorischen Umsatz der normalen und nebennierenlosen Tiere untersucht.

Die Ergebnisse dieser Versuche teile ich im einzelnen in Tabelle VIII mit, während Tabelle IX eine Zusammenfassung der Gesamtergebnisse der Tabelle VIII enthält.

Das Wesentlichste in dieser Versuchsreihe war mir der Vergleich des Einflusses von Lävulose auf den Stoffwechsel ohne und mit Schilddrüsenfütterung bei normalen Tieren und bei Tieren, denen beide Nebennieren exstirpiert worden waren.

Sieht man von kleinen Schwankungen ab, so ist das Gesamtergebnis ein ziemlich gleichmäßiges Verhalten der Lävulose in beiden Versuchsreihen. Auch hier fehlt ein sicherer Anhaltspunkt dafür, daß die Nebenniere an der Ratte einen irgendwie merklichen Einfluß auf den Kohlehydratstoffwechsel hat. Vielleicht gehört dieser Umstand mit zu den Bedingungen, weshalb die Entfernung der Nebenniere so gut von Ratten vertragen wird. Doch bleibt diese Annahme so lange hypothetisch, bis man nicht in den Stand gesetzt worden ist, an anderen Tieren eine Prüfung vorzunehmen.

Zusammengefaßt, sind die Ergebnisse dieser Untersuchung die nachfolgenden:

1. Die vollständige Exstirpation beider Nebennieren ändert am respiratorischen Grundumsatz der Ratten entweder nichts oder führt nur zu einer geringfügigen Herabsetzung des respiratorischen Umsatzes.

2. Der Ablauf der Stoffwechselvorgänge nach Zufuhr von Kohlehydraten wird durch die Entfernung der Nebennieren nicht wesentlich beeinflußt.

3. Auch Zufuhr von Schilddrüse läßt den Ablauf des Kohlehydratstoffwechsels bei normalen und schilddrüsenlosen Ratten annähernd gleichbleiben.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 73.

Über die Wirkung von Schilddrüsen- und Milzexstirpation auf den durch Adrenalininjektion beeinflußten respiratorischen Grundumsatz.

Von

Kimio Nakayama.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 8. Januar 1925.)

Die Beziehungen zwischen Schilddrüsen und Milz sind schon in einer großen Reihe von Arbeiten des Berner physiologischen Instituts einer sehr eingehenden Untersuchung unterworfen worden, wobei sich eine recht große Kompliziertheit der Beziehungen herausgestellt hat, Beziehungen, die durchaus nicht einheitlicher Natur sind. Es hat besonderer methodischer Reaktionen bedurft, um im Einzelfall den Vorgängen auf die Spur zu kommen und die komplizierten Folgeerscheinungen der Milzexstirpation in einzelne Faktoren zu zerlegen. Erst diese Zerlegung hat dazu geführt, wohldefinierte Einzelfunktionen der Milz kennenzulernen, d. h. Beziehungen der Milz zu einzelnen Organen, die von Organ zu Organ wechseln können.

Die nachfolgende Arbeit beschäftigt sich mit einer erneuten Untersuchung der Beziehungen zwischen Milz und Schilddrüse, und ich wurde zu dieser Untersuchung angeregt durch die Erfahrungen, welche ich in der vorhergehenden Arbeit mitgeteilt habe, die darin bestanden, daß Adrenalininjektionen auf den respiratorischen Grundumsatz der normalen und schilddrüsenlosen Ratte verschieden wirkte. Meine nachfolgenden Versuche wurden im großen ganzen genau so ausgeführt, wie diejenigen in meiner früheren Arbeit, denn ich habe auch zum Vergleich der Resultate aus dieser früheren Arbeit eine Reihe von Protokollen mit herangezogen.

Meine Versuche zerfallen in vier Reihen. In der ersten Reihe wurde die Schilddrüse exstirpiert, später die Milz. In einer zweiten Reihe wurde nur die Milz exstirpiert. In einer dritten Reihe wurden in einer und derselben Sitzung Milz und Schilddrüse entfernt. In der vierten Reihe wurde zuerst die Milz und darauf die Schilddrüse entfernt.

Alle zum Versuch dienenden Ratten wurden mit Milch und Brot ernährt und blieben 16 Stunden vor Anstellung des Versuchs ohne Nahrung. Der respiratorische Umsatz wurde nach der im Berner physiologischen Institut üblichen Methode untersucht. Als Adrenalinlösung benutzte ich Original-Adrenalinlösung von Parke, Davies & Co. (1 : 1000).

Tabellen I und II enthalten die Protokolle über die Versuchsreihe, wo zuerst die Schilddrüse und dann die Milz entfernt worden war. In der zusammenfassenden Tabelle II bringe ich zum Vergleich den Grundumsatz vor der Operation und nach der Schilddrüsenentfernung aus meiner vorhergehenden Arbeit über das Zusammenwirken von Schilddrüse und Nebenniere, geprüft am respiratorischen Stoffwechsel. Es ergibt sich, daß die Adrenalininjektion nach der Schilddrüsenentfernung und nach der Entmilzung in dieser ersten Versuchsreihe annähernd gleich wirkt wie nach der Schilddrüsenentfernung, sogar etwas weniger als vorher, denn, in Kalorien ausgedrückt, erhöhte die Adrenalininjektion die Kalorienbildung vor jeder Operation um 45,15 Proz. im Mittel, nach der Schilddrüsenexstirpation um 12,5 Proz., nach Entfernung von Schilddrüse und Milz noch um 10,62 Proz.

In Tabellen III und IV bringe ich weitere Beispiele der gleichen Versuchsanordnung, wo die weitere Herabsetzung der Wirkung von Adrenalin nach der Entmilzung noch deutlicher zutage tritt. Am normalen Tiere erhöhte durchschnittlich die Adrenalininjektion die Kalorienbildung, um nur diese zu erwähnen, um 46,48 Proz., nach der Schilddrüsenentfernung nur noch 20,68 Proz. Die Steigerung infolge der Adrenalininjektion sank noch weiter auf 14,85 Proz., nachdem die Milz entfernt worden war.

In der nachfolgenden Versuchsreihe teile ich meine Ergebnisse nach bloßer Entfernung der Milz mit. Die drei Versuchsreihen haben im großen ganzen ein übereinstimmendes Ergebnis. In der einen Reihe betrug die prozentische Steigerung der Kalorienbildung infolge der Adrenalininjektion im Mittel 47,59 Proz., nach der Entmilzung nur noch 31,82 Proz. In der anderen Reihe war die Steigerung vor der Entmilzung 63,49 Proz., nach der Entmilzung 23,20 Proz. und in der dritten Versuchsreihe vor der Entmilzung 29,30 Proz. Wenngleich sich individuelle Unterschiede der einzelnen Versuchsreihen zeigen, tritt doch das Hauptergebnis klar zutage, nämlich die wesentlich geringere Anspruchsfähigkeit auf Adrenalininjektion nach Entfernung der Milz.

Tabelle I. 5. Gruppe. Weiße Ratu

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Stdn.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g
					Die Versuche mit	Adrenalin	nach de	
24	14. VII.	3,0	22	26	152,84	0,36	0,79	0,79
		3,0	22	27	151,46	0,28	0,97	0,99
		2,0	22	27	151,20	0,31	0,61	0,62
25	16. VII.	3,0	22	26	153,38	0,27	0,91	0,89
		3,0	23	26	152,05	0,34	0,94	0,91
		2,0	23	26	151,63	0,31	0,69	0,67
26	18. VII.	3,0	19	26	154,15	0,28	0,75	0,76
		3,0	21	26	151,90	0,30	0,95	0,93
		2,0	20	26	151,58	0,17	0,56	0,56
27	22. VII.	3,0	21	26	154,07	0,48	0,87	0,87
		3,0	21	26	152,70	0,36	0,99	1,00
		2,0	21	26	153,35	0,20	0,59	0,58
28	24. VII.	3,0	20	26	150,05	0,41	0,90	0,89
		3,0	19	25	148,95	0,36	1,04	1,00
		2,0	19	25	148,55	0,17	0,63	0,62
29	26. VII.	3,0	19	25	152,07	0,31	1,03	0,97
30	28. VII.	3,0	18	25	149,86	0,21	0,82	0,80
		3,0	19	26	148,10	0,43	0,86	0,86
		2,0	19	26	147,68	0,20	0,72	0,62
31	30. VII.	3,0	17	25	148,47	0,18	0,87	0,83
		3,0	18	25	147,68	0,22	0,90	0,89
		2,0	18	24	147,45	0,10	0,65	0,56
32	1. VIII.	3,0	18	25	143,08	0,27	0,84	0,74
		3,0	19	25	141,40	0,28	0,92	0,84
		2,0	19	25	141,04	0,13	0,60	0,50
33	1. VIII.	3,0	18	24	148,86	0,19	0,90	0,90
		3,0	18	25	146,54	0,28	0,92	0,91
		2,0	18	24	146,25	0,14	0,57	0,58
34	4. VIII.	3,0	19	25	150,78	0,29	0,86	0,85
		3,0	19	24	149,78	0,25	0,91	0,90
		2,0	19	26	149,37	0,12	0,61	0,58

(Männchen). Schilddrüsenloses Tier.

Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Kalorienbildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2 Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung pro kg und Stunde Proz.	Bemerkungen
Entmilzung. Am 11. VII. Milz entfernt.							
0,725	1,723	1,723	5,80	—	—	—	Nüchtern
0,712	2,135	2,179	7,31	23,91	21,02	26,03	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
0,715	2,017	2,050	6,89	17,06	18,98	18,79	
0,743	1,978	1,934	6,53	—	—	—	Nüchtern
0,750	2,061	1,995	6,74	4,20	3,15	3,22	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
0,748	2,275	2,209	7,47	15,02	14,22	14,41	
0,717	1,622	1,643	5,52	—	—	—	Nüchtern
0,742	2,085	2,041	6,89	28,55	24,22	24,80	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
0,725	1,805	1,805	6,22	11,28	9,86	12,67	
0,725	1,882	1,882	6,34	—	—	—	Nüchtern
0,719	2,161	2,183	7,34	14,82	15,99	15,78	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
0,739	1,936	1,904	6,42	2,87	1,17	1,26	
0,735	1,999	1,977	6,67	—	—	—	Nüchtern
0,755	2,327	2,238	7,58	16,41	13.20	13,64	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
0,738	2,121	2,087	7,04	6,10	5,56	5,55	
0,771	2,258	2,176	7,21	—	—	—	0,1 mg Adrenalin
0,745	1,824	1,779	6,02	—	—	—	Nüchtern
0,725	1,936	1,936	6,52	6,14	8,82	8,31	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
0,844	2,438	2,099	7,22	33,66	17,98	19,95	
0,761	1,953	1,864	6,31	—	—	—	Nüchtern
0,735	2,031	2,009	6,78	3,99	7,78	7,45	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
0,843	2,204	1,899	6,53	12,85	1,88	3,49	
0,825	1,957	1,724	8,45	—	—	—	Nüchtern
0,796	2,169	1,980	9,65	10,83	14,85	14,20	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
0,872	2,127	1,773	8,75	8,69	2,84	3,55	
0,725	2,015	2,015	6,79	—	—	—	Nüchtern
0,734	2,092	2,070	6,97	3,82	2,73	2,65	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
0,714	1,949	1,983	6,65	— 3,27	— 1,59	— 2,11	
0,735	1,901	1,879	6,34	—	—	—	Nüchtern
0,733	2,025	2,003	6,74	6,52	6,60	6,31	0,1 mg Adrenalin intramuskulär
0,730	2,042	1.942	6,54	7,42	3,35	3,16	

Tabelle II. Die zusammengefaßten Ergebnisse 1. 5. Gruppe. Weiße Ratte (Männchen).

Versuchsarten	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Respirationsquotient	Kalorienbildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung pro kg und Stunde Proz.	Bemerkungen
Ruheumsatz	2,184	2,139	0,742	7,22	—	—	—	Vor der Operation*)
Erste 3 Stdn. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (intramuskulär)	3,285	3,106	0,768	10,53	50,41	45,21	45,85	
4. Std. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (intramuskulär)	3,098	3,052	0,737	10,30	41,85	42,68	42,94	
Mittelwert während 4 Stdn. nach der Injektion	3,238	3,093	0,760	10,48	48,26	44,60	45,15	
Ruheumsatz	2,024	2,000	0,735	6,76	—	—	—	Nach der Schilddrüsenentfernung*)
Erste 3 Stdn. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (intramuskulär)	2,192	2,151	0,740	7,26	8,30	7,55	7,40	
4. bis 5. Std. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (intramuskulär)	2,549	2,394	0,773	8,12	25,94	19,70	20,12	
Mittelwert während 5 Stdn. nach der Injektion	2,335	2,248	0,755	7,61	15,37	12,40	12,57	
Ruheumsatz	1,883	1,842	0,743	6,21	—	—	—	Nach der Entmilzung
Erste 3 Stdn. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (intramuskulär)	2,116	2,073	0,742	6,99	12,37	12,54	12,55	
4. bis 5. Std. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (intramuskulär)	2,091	1,974	0,769	6,70	11,05	7,17	7,88	
Mittelwert während 5 Stdn. nach der Injektion	2,106	2,033	0,753	6,87	11,84	10,37	10,62	

*) Genaue Protokolle sind in der vorhergehenden Arbeit „Über das Zusammenwirken von Schilddrüse und Nebenniere" geprüft am respiratorischen Stoffwechsel.

Die Versuche nach der Entmilzung. Am 27. VII. Milz entfernt.

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Std.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g	Respirationsquotienten	CO_2-Bildung pro kg u. Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg u. Stunde g	Kalorienbildung pro kg u. Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung pro kg und Stunde Proz.	Bemerkungen
23	23. VII.	3,0	20	24	242,24	0,29	1,27	1,18	0,782	1,748	1,624	5,52	—	—	—	Nüchtern
		3,0	20	25	240,54	0,38	1,44	1,36	0,769	1,996	1,885	6,39	14,19	16,07	15,76	0,1 mg Adrenalin
		2,0	20	26	240,08	0,20	0,83	0,74	0,815	1,729	1,541	5,28	— 1,09	— 5,11	— 4,34	subkutan
24	25. VII.	3,0	19	26	233,27	0,41	1,23	1,13	0,791	1,758	1,615	5,50	—	—	—	Nüchtern
		3,0	19	26	229,11	0,27	1,48	1,38	0,779	2,153	2,008	6,83	22,47	24,34	24,18	0,1 mg Adrenalin
		2,0	19	26	228.74	0,22	1,01	0,93	0,789	2,208	2,033	6,92	25,60	25,89	25,82	subkutan
25	28. VII.	3,0	18	24	224,00	0,25	1,15	1,09	0,766	1,711	1,622	5,50	—	—	—	Nüchtern
		3,0	19	26	221,67	0,32	1,42	1,35	0,764	2,135	2,030	6,88	24,78	25,15	25,07	0,1 mg Adrenalin
		2,0	19	25	221,28	0,20	0,88	0,85	0,752	1,988	1,921	6,49	16,19	18,43!	17,99	subkutan
26	30. VII.	3,0	17	24	225,71	0,38	1,39	1,27	0,795	2,053	1,876	6,40	—	—	—	Nüchtern
		3,0	18	25	221,99	0,31	1,44	1,28	0,797	2.162	1,922	6,56	5,31	2,45	2,50	0,1 mg Adrenalin
		2,0	18	26	221,52	0,23	1,05	0,90	0,848	2,370	2,031	7,00	15,44	8,26	9,37	subkutan

Tabelle IV. Die zusammengefaßten Ergebnisse 2. 5. Gruppe. Schwanzgefärbte Ratte (Männchen).

Versuchsarten	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Respirationsquotient	Kalorienbildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung d. Kalorienbildung pro kg und Stunde Proz.	Bemerkungen
Ruheumsatz	1,770	1,726	0,745	5,83	—	—	—	Vor der Operation *
Erste 3 Stdn. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	2,683	2,545	0,766	8,63	51,58	47,45	48,03	
4. Std. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	2,598	2,437	0,774	8,29	46,78	41,19	42,20	
Mittelwert während 4 Stdn. nach d. Injektion	2,662	2,518	0,768	8,54	50,40	45,89	46,48	
Ruheumsatz	1,754	1,657	0,765	5,61	—	—	—	Nach der Schilddrüsenentfernung*)
Erste 3 Stdn. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	2,138	2,022	0,768	6,86	22,52	22,04	22,28	
4. bis 5. Std. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	2,044	1,952	0,761	6,61	17,14	17,80	17,83	
Mittelwert während 5 Stdn. nach d. Injektion	2,100	1,994	0,765	6,77	19,73	20,34	20,68	
Ruheumsatz	1,818	1,684	0,784	5,72	—	—	—	Nach der Entmilzung
Erste 3 Stdn. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	2,112	1,961	0,782	6,69	16,17	16,45	16,94	
4. bis 5. Std. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	2,074	1,882	0,801	6,39	14,08	11,76	11,70	
Mittelwert während 5 Stdn. nach d. Injektion	2,097	1,929	0,790	6,57	15,35	14,55	14,85	

*) Genaue Protokolle sind in meiner früheren Arbeit.

Tabelle V. **6. Gru**

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Stdn.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g
					Die Versuche mit Adrenal			
1	23. VI.	3,0	19	23	115,16	0,22	1,08	1,00
		3,0	17	24	114,56	0,29	1,31	1,28
		1,0	17	25	113,74	0,11	0,43	0,43
		1,0	17	23	113,63	0,14	0,42	0,43
2	25. VI.	3,0	18	24	107,82	0,24	0,84	0,81
		3,0	18	24	107,41	0,35	1,51	1,41
		1,0	18	24	106,96	0,11	0,47	0,43
3	26. VI.	3,0	19	24	107,22	0,30	0,89	0,85
		3,0	19	25	106,95	0,38	1,45	1,40
		1,0	19	25	106,12	0,06	0,32	0,32
4	1. VII.	3,0	20	24	116,20	0,23	0,81	0,77
		3,0	20	26	114,41	0,27	1,36	1,25
		2,0	20	25	114,03	0,19	0,78	0,79
5	3. VII.	2,0	20	25	115,34	0,19	0,58	0,52
		3,0	20	26	114,63	0,24	1,44	1,33
		2,0	20	25	114,28	0,15	0,78	0,75
6	8. VII.	3,0	20	24	129,51	0,62	0,97	0,95
		3,0	20	25	127,31	0,61	1,42	1,34
		2,0	20	25	126,62	0,25	0,68	0,68
					Die Versuche mit	Adrenalin	nach de	
7	14. VII.	3,0	22	25	128,17	0,33	0,83	0,83
		3,0	22	27	127,37	0,51	1,18	1,10
		2,0	22	27	126,78	0,43	0,92	0,87
8	16. VII.	3,0	22	25	124,49	0,40	0,79	0,75
		3,0	23	26	123,71	0,38	1,13	1,04
		2,0	23	26	123,27	0,27	0,64	0,63
9	18. VII.	3,0	19	24	125,21	0,57	0,80	0,75
		3,0	21	26	122,83	0,51	1,15	1,09
		2,0	20	25	122,26	0,30	0,62	0,60
10	22. VII.	3,0	21	26	135,40	0,30	1,06	1,01
		3,0	21	26	134,03	0,16	1,09	1,02
		2,0	21	26	133,80	0,19	0,83	0,80
11	24. VII.	3,0	19	25	136,85	0,31	0,89	0,86
		3,0	19	26	135,22	0,32	1,28	1,24
		2,0	19	25	134,86	0,24	0,65	0,62
12	26. VII.	3,0	19	25	135,72	0,29	1,25	1,18
13	29. VII.	3,0	18	24	141,34	0,21	0,87	0,86
		3,0	19	26	139,24	0,30	1,30	1,23
		2,0	18	25	138,87	0,20	0,71	0,72

Schwanzgefärbte Ratte (Männchen).

Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Kalorienbildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung pro kg und Stunde Proz.	Bemerkungen
vor der Entmilzung.							
0,785	3,126	2,895	9,86	—	—	—	Nüchtern
0,743	3,828	3,741	12,62	22,46	29,91	28,00	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,725	3,781	3,781	12,73	20,95	29,91	29,11	
0,710	3,696	3,784	12,99	18,23	30,71	31,75	
0,753	2,597	2,504	8,47	—	—	—	Nüchtern
0,778	4,686	4,376	14,88	80,44	74,76	75,73	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,794	4,394	4,020	13,69	69,20	60,54	61,67	
0,701	2,831	2,704	9,15	—	—	—	Nüchtern
0,752	4,519	4,363	14,75	59,62	61,35	61,23	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,725	3,016	3,016	10,16	6,53	11,54	11,04	
0,764	2,324	2,209	7,48	—	—	—	Nüchtern
0,790	3,962	3,642	12,40	70,50	64,88	65,77	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,717	3,420	3,464	11,64	47,17	56,82	55,61	
0,810	2,514	2,254	7,71	—	—	—	Nüchtern
0,787	4,187	3,868	13,17	66,54	71,60	70,85	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,756	3,413	3,281	11,11	35,76	45,56	44,12	
0,742	2,497	2,445	8,25	—	—	—	Nüchtern
0,770	3,718	3,509	11,91	48,91	43,52	44,37	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,725	2,685	2,685	9,04	7,53	9,82	9,58	
Entmilzung. Am 11. VII. Milz entfernt.							
0,725	2,159	2,159	7,27	—	—	—	Nüchtern
0,779	3,088	2,879	9,79	43,04	33,36	34,67	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,768	3,628	3,431	11,64	68,05	58,93	60,12	
0,765	2,115	2,008	6,81	—	—	—	Nüchtern
0,789	3,045	2,802	9,54	43,97	39,45	40,06	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,738	2,596	2,555	8,62	22,74	22,26	26,56	
0,775	2,130	1,997	6,79	—	—	—	Nüchtern
0,766	3,121	2,958	10,04	46,53	48,13	47,88	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,751	2,536	2,454	8,30	19,06	22,89	22,25	
0,762	2,610	2,487	8,42	—	—	—	Nüchtern
0,776	2,711	2,537	8,62	3,87	2,01	2,38	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,754	3,102	2,990	10,11	18,85	20,23	20,06	
0,752	2,168	2,095	7,07	—	—	—	Nüchtern
0,750	3,155	3,057	10,33	50,14	49,52	46,15	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,762	2,410	2,299	7,78	11,16	9,74	10,05	
0,770	3,070	2,898	9,83	—	—	—	0,1 mg Adrenalin
0,735	2,052	2,028	6,84	—	—	—	Nüchtern
0,766	3,105	2,945	9,99	51,32	45,21	46,03	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,716	2,556	2,592	8,71	24,56	27,81	27,33	

Tabelle VI.

Die zusammengefaßten Ergebnisse 3. 6. Gruppe. Schwanzgefärbte Ratte (Männchen).

Versuchsarten	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Respirationsquotient	Kalorienbildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung pro kg und Stunde Proz.	Bemerkungen
Ruheumsatz	2,642	2,502	0,767	8,49	—	—	—	
Erste 3 Stdn. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	4,150	3,917	0,770	13,29	57,08	56,56	56,54	Vor der Entmilzung
4. bis 5. Std. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	3,445	3,372	0,742	11,37	30,39	34,77	33,92	
Mittelwert während 5 Stdn. nach der Injektion	3,868	3,699	0,760	12,53	46,40	47,84	47,59	
Ruheumsatz	2,206	2,129	0,753	7,20	—	—	—	
Erste 3 Stdn. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	3,042	2,868	0,771	9,73	37,90	34,71	35,16	Nach der Entmilzung
4. bis 5. Std. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	2,805	2,720	0,749	9,17	27,15	27,76	27,37	
Mittelwert während 5 Stdn. nach der Injektion	2,947	2,809	0,762	9,49	33,59	31,94	31,82	

Tabelle VII.

Die zusammengefaßten Ergebnisse 4. 6. Gruppe. Kopfgefärbte Ratte (Männchen).

Versuchsarten	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Respirationsquotient	Kalorienbildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung pro kg und Stunde Proz.	Bemerkungen
Ruheumsatz	2,322	2,311	0,730	7,78	—	—	—	Vor der Entmilzung
Erste 3 Stdn. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	4,250	4,157	0,743	14,03	83,03	79,88	80,31	
4. bis 5. Std. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	2,791	2,833	0,716	9,52	20,20	22,59	22,36	
Mittelwert während 5 Stdn. nach der Injektion	3,666	3,627	0,734	12,21	63,85	63,64	63,49	
Ruheumsatz	2,360	2,207	0,777	7,50	—	—	—	Nach der Entmilzung
Erste 3 Stdn. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	3,098	2,943	0,765	9,99	31,27	33,35	33,19	
4. bis 5. Std. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	2,663	2,580	0,750	8,72	12,84	16,90	16,26	
Mittelwert während 5 Stdn. nach der Injektion	2,924	2,798	0,759	9,48	21,08	23,50	23,20	

Tabelle VIII. **6. G[illegible]**

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Stdn.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	C[illegible] Verb[illegible]
					Die Versuche mit Adre[illegible]			
1	26. VI.	3,0	19	25	118,49	0,24	0,91	[illegible]
		3,0	19	25	114,33	0,28	1,55	[illegible]
		2,0	19	25	113,99	0,18	0,66	[illegible]
2	1. VII.	3,0	20	24	117,85	0,41	0,89	[illegible]
		3,0	20	24	116,03	0,85	1,42	[illegible]
		2,0	20	24	115,08	0,25	0,64	[illegible]
3	3. VII.	2,0	20	24	120,30	0,30	0,59	[illegible]
		3,0	20	25	118,59	0,28	1,46	[illegible]
		2,0	20	25	118,30	0,22	0,70	[illegible]
4	7. VII.	3,0	20	25	124,98	0,36	0,76	[illegible]
		3,0	20	25	122,48	0,42	1,60	[illegible]
		2,0	20	25	122,05	0,31	0,69	[illegible]
5	9. VII.	3,5	20	25	129,29	0,34	0,95	[illegible]
		3,0	20	26	126,98	0,63	1,60	[illegible]
		2,0	20	25	126,28	0,21	0,63	[illegible]
					Die Versuche mit Adrenalin nach[illegible]			
6	14. VII.	3,0	22	26	126,83	0,29	0,95	[illegible]
		3,0	22	26	124,92	0,33	1,43	[illegible]
		2,0	22	26	124,51	0,32	0,74	[illegible]
7	16. VII.	3,0	22	26	126,09	0,26	0,98	[illegible]
		3,0	23	26	124,45	0,22	1,11	[illegible]
8	18. VII.	3,0	19	25	126,03	0,27	0,97	[illegible]
		3,0	21	26	124,81	0,36	1,34	[illegible]
		2,0	20	26	124,38	0,17	0,73	[illegible]
9	22. VII.	3,0	21	24	148,41	0,30	0,90	[illegible]
		3,0	21	26	146,94	0,68	1,58	[illegible]
		2,0	21	25	146,24	0,38	0,79	[illegible]
10	24. VII.	3,0	19	24	147,54	0,19	1,07	[illegible]
		3,0	19	25	146,20	0,22	1,17	[illegible]
		2,0	19	25	145,90	0,14	0,79	[illegible]
11	26. VII.	3,0	19	24	148,56	0,30	1,01	0,91
12	29. VII.	3,0	18	23	154,96	0,21	0,99	[illegible]
		3,0	19	25	153,81	0,32	1,42	[illegible]
		2,0	18	25	153,21	0,17	0,80	[illegible]
13	31. VII.	3,0	18	25	146,89	0,24	1,16	1,10
		3,0	18	25	146,01	0,24	1,61	1,51
		2,0	18	26	145,67	0,16	0,80	[illegible]
14	2. VIII.	3,0	18	25	152,75	0,43	1,31	[illegible]
15	4. VIII.	3,0	18	24	152,12	0,25	1,12	[illegible]
		3,0	18	25	149,05	0,47	1,27	[illegible]
		2,0	18	25	148,49	0,12	0,72	[illegible]
16	6. VIII.	3,0	19	24	150,26	0,23	0,87	[illegible]
		3,0	19	25	149,08	0,48	1,27	[illegible]
		2,0	19	25	148,57	0,15	0,67	0,64

ärbte Ratte (Männchen).

), ... t	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Kalorienbildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung pro kg und Stunde Proz.	Bemerkungen
Entmilzung.							
	2,560	2,504	8,45	—	—	—	Nüchtern
	4,519	4,344	14,71	76,52	73,49	74,11	0,1 mg Adrenalin subkutan
	2,895	2,895	9,75	13,09	15,62	15,39	
	2,517	2,489	8,40	—	—	—	Nüchtern
	4,073	4,022	13,57	62,05	61,59	61,57	0,1 mg Adrenalin subkutan
	2,781	2,911	9,92	10,49	16,95	18,10	
	2,452	2,410	8,13	—	—	—	Nüchtern
1	4,104	4,076	13,73	67,45	69,13	68,87	0,1 mg Adrenalin subkutan
5	2,959	2,959	9,96	20,68	22,78	22,51	
7	2,027	2,054	6,90	—	—	—	Nüchtern
1	4,355	4,327	14,57	114,85	110,68	111,12	0,1 mg Adrenalin subkutan
6	2,827	2,868	9,64	38,75	39,64	39,70	
1	2,055	2,099	7,04	—	—	—	Nüchtern
0	4,200	4,016	13,60	104,37	91,31	93,15	0,1 mg Adrenalin subkutan
5	2,495	2,534	8,52	21,41	20,67	21,02	
ilzung. Am 11. VII. Milz entfernt.							
13	2,497	2,260	7,71	—	—	—	Nüchtern
52	3,816	3,602	12,18	52,83	59,37	59,38	0,1 mg Adrenalin subkutan
51	2,972	2,811	9,50	19,02	24,38	23,21	
74	2,591	2,432	8,25	—	—	—	Nüchtern
47	2,973	2,893	9,78	14,75	18,96	18,54	0,1 mg Adrenalin
74	2,566	2,407	8,17	—	—	—	Nüchtern
67	3,579	3,392	11,51	39,95	40,14	40,90	0,1 mg Adrenalin subkutan
47	2,935	2,854	9,65	14,55	18,22	18,12	
69	2,021	1,909	6,48	—	—	—	Nüchtern
39	3,584	3,539	11,94	77,32	85,38	84,29	0,1 mg Adrenalin subkutan
65	2,701	2,564	8,70	33,64	34,31	34,27	
62	2,417	2,305	7,81	—	—	—	Nüchtern
80	2,668	2,485	8,45	10,38	7,81	8,20	0,1 mg Adrenalin subkutan
45	2,707	2,639	8,92	12,00	14,49	14,22	
806	2,266	2,042	6,98	—	—	—	0,1 mg Adrenalin
773	2,130	2,001	6,79	—	—	—	Nüchtern
758	3,077	2,945	9,98	44,47	47,19	47,00	0,1 mg Adrenalin subkutan
,755	2,611	2,513	8,51	22,59	25,59	25,93	
,766	2,632	2,496	12,10	—	—	—	Nüchtern
,775	3,676	3,447	16,74	39,66	38,10	38,35	0,1 mg Adrenalin subkutan
,755	2,746	2,643	12,79	4,33	5,89	5,70	
,793	2,859	2,619	8,92	—	—	—	0,1 mg Adrenalin
,768	2,454	2,323	7,88	—	—	—	Nüchtern
,782	2,840	2,639	8,97	15,73	13,61	13,83	0,1 mg Adrenalin subkutan
,716	2,424	2,458	8,26	– 1,22	5,81	4,82	
,810	1,930	1,730	5,92	—	—	—	Nüchtern
0,744	2,840	2,773	9,35	47,15	60,28	57,98	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,760	2,204	2,154	7,29	14,20	24,50	23,16	

Tabelle IX. 6. Gruppe. Rücken

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Stdn.	Zimmertemperatur °C	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g
					Die Versuche mit Adrenalin			
1	30. VI.	3,0	20	25	136,92	0,25	0,87	0,87
2	4. VII.	3,0	20	25	146,59	0,23	0,98	0,95
3	5. VII.	3,0	20	25	149,83	0,41	0,94	0,91
4	7. VII.	3,0	20	25	143,69	0,33	1,00	0,96
5	15. VII.	3,0	22	26	139,60	0,31	0,94	0,92
		3,0	22	27	138,48	0,34	1,18	1,18
		2,0	22	27	138,14	0,27	0,77	0,78
6	17. VII.	3,0	21	24	135,77	0,29	0,79	0,79
		3,0	22	27	135,20	0,35	1,19	1,16
		2,0	22	27	134,82	0,22	0,65	0,63
7	19. VII.	3,0	20	26	133,95	0,28	1,30	1,21
		1,0	20	26	133,58	0,15	0,43	0,44
8	21. VII.	3,0	20	27	133,88	0,29	0,85	0,81
		3,0	21	27	132,42	0,40	1,09	1,05
		2,0	21	26	131,98	0,40	0,62	0,62
					Die Versuche mit Adrenalin nach der			
9	25. VII.	3,0	19	24	134,50	0,22	1,01	0,95
		3,0	19	24	132,41	0,18	0,94	0,98
		2,0	19	24	132,22	0,14	0,74	0,71
10	28. VII.	3,0	18	24	125,56	0,19	0,96	0,92
		3,0	19	24	124,39	0,16	1,15	1,05
		2,0	19	24	124,13	0,10	0,62	0,63
11	30. VII.	3,0	17	24	121,77	0,19	1,08	1,05
		3,0	18	24	120,20	0,15	1,02	0,95
		2,0	18	24	119,98	0,12	0,77	0,66
12	1. VIII.	3,0	18	25	118,69	0,34	0,92	0,86
		3,0	19	25	117,86	0,28	1,28	1,14
		2,0	19	25	117,44	0,17	0,71	0,65
13	4. VIII.	3,0	18	24	124,89	0,25	1,13	1,05
		3,0	18	25	122,68	0,30	1,38	1,31
		2,0	18	25	122,31	0,11	0,68	0,68
14	6. VIII.	3,0	19	24	114,93	0,17	0,82	0,76
		3,0	19	24	113,97	0,19	1,09	1,02
		2,0	19	24	113,71	0,09	0,60	0,62

gefärbte Ratte (Männchen).

Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Kalorienbildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung pro kg und Stunde Proz.	Bemerkungen
vor der Entmilzung.							
0,725	2,118	2,118	7,13	—	—	—	Nüchtern
0,791	2,228	2,094	6,97	—	—	—	"
0,750	2,091	2,025	6,84	—	—	—	"
0,757	2,320	2,227	7,54	—	—	—	"
0,742	2,245	2,197	7,41	—	—	—	"
0,725	2,840	2,840	9,57	26,51	29,27	29,14	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,717	2,787	2,823	9,49	24,15	28,50	28,06	
0,725	1,940	1,940	6,53	—	—	—	Nüchtern
0,745	2,934	2,860	9,67	51,25	47,43	48,08	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,750	2,411	2,337	7,90	24,28	20,47	20,98	
0,781	3,235	3,011	10,24	—	—	—	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,710	3,219	3,094	11,05	—	—	—	
0,762	2,116	2,017	6,83	—	—	—	Nüchtern
0,754	2,744	2,643	8,93	29,76	31,04	30,75	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,725	2,349	2,349	7,91	11,01	16,46	15,81	
Entmilzung. Am 23. VII. Milz entfernt.							
0,772	2,503	2,354	7,99	—	—	—	Nüchtern
0,734	2,492	2,467	8,31	— 0,44	4,80	4,01	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,757	2,798	2,685	9,00	11,79	14,06	13,77	
0,758	2,549	2,442	8,27	—	—	—	Nüchtern
0,796	3,082	2,814	9,60	20,91	15,23	16,08	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,715	2,497	2,538	8,53	— 2,04	3,93	3,14	
0,747	2,956	2,874	9,72	—	—	—	Nüchtern
0,780	2,829	2,635	8,96	— 4,30	— 8,32	— 7,82	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,848	3,207	2,749	9,47	8,49	— 4,35	— 2,57	
0,777	2,584	2,415	11,73	—	—	—	Nüchtern
0,816	3,620	3,224	15,78	40,10	33,50	34,53	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,793	3,016	2,761	13,43	16,72	14,33	14,49	
0,782	3,086	2,803	9,55	—	—	—	Nüchtern
0,765	3,750	3,559	12,10	22,02	26,98	26,72	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,725	2,780	2,780	9,36	— 10,15	— 0,82	— 1,99	
0,784	2,378	2,204	7,49	—	—	—	Nüchtern
0,776	3,188	2,983	10,14	34,06	35,34	35,36	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,703	2,638	2,726	9,15	10,93	23,66	22,15	

Tabelle X. Zusammengefaßte Ergebnisse 5. 6. Gruppe. Rückengefärbte Ratte (Männchen).

Versuchsarten	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Respirationsquotient	Kalorienbildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung pro kg und Stunde Proz.	Bemerkungen
Ruheumsatz	2,151	2,088	0,748	7,06	—	—	—	Vor der Entmilzung
Erste 3 Std. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	2,938	2,839	0,752	9,60	36,59	35,97	35,99	
4. bis 5. Std. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	2,692	2,651	0,738	8,94	25,15	26,96	26,64	
Mittelwert während 5 Std. nach der Injektion	2,840	2,764	0,746	9,34	29,67	29,25	29,30	
Ruheumsatz	2,676	2,515	0,773	8,53	—	—	—	Nach der Entmilzung
Erste 3 Std. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	3,160	2,947	0,779	10,02	18,09	17,18	17,46	
4. bis 5. Std. nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	2,823	2,707	0,758	9,17	5,49	7,63	7,50	
Mittelwert während 5 Std. nach der Injektion	3,025	2,851	0,771	9,67	14,79	15,22	15,19	

Tabelle XI. Zusammengefaßte Ergebnisse 6. 9. Gruppe. Schwanzgefärbte Ratte (Weibchen).

Versuchsarten	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Respirationsquotient	Kalorienbildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung pro kg und Stunde Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs pro kg und Stunde Proz.	Steigerung der Kalorienbildung pro kg und Stunde Proz.	Bemerkungen
Ruheumsatz	2,060	1,881	0,796	6,40	—	—	—	Vor der Operation
Nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	2,375	2,249	0,767	7,78	18,71	19,29	19,35	
Ruheumsatz	1,764	1,698	0,755	5,77	—	—	—	Nach der Milz- und Schilddrüsenentfernung
Nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan)	2,265	2,097	0,785	7,12	26,61	23,81	23,76	

In der nächsten Versuchsreihe berichte ich über die Versuche, in denen die Entfernung der Milz und der Schilddrüse gleichzeitig bewerkstelligt wurden.

In dieser Gruppe treten die Widersprüche, denen man so häufig begegnet, offensichtlich zutage, denn bei dem einen Versuchstier kam es bei gleichzeitiger Entfernung der Milz und der Schilddrüse zu einer Steigerung des respiratorischen Grundumsatzes und der Kalorienbildung infolge von Adrenalininjektionen gegenüber der Zeit vor der Operation. Beschränke ich mich auf die Größe der Kalorienbildung, so ist die prozentische Steigerung vor der Operation infolge von Adrenalininjektion 19,53 Proz., nach der Operation aber 23,76 Proz. Hier hatte unzweifelhaft die gleichzeitige Entfernung von Schilddrüse und Milz eher im Sinne einer Steigerung gewirkt, ganz anders bei dem anderen Versuchstier, wo vor der Operation die Kalorienbildung 31,97 Proz. durch Adrenalininjektion gesteigert wurde, während nach der doppelten Operation die Steigerung nur 11,33 Proz. betrug.

In der letzten Versuchsreihe habe ich zunächst die Milz entfernt und erst später die Schilddrüse. Auch hier ist das Ergebnis ein sehr bemerkenswertes. Nach bloßer Entfernung der Milz betrug die prozentische Steigerung des Grundumsatzes durch Adrenalininjektion für die Kohlensäurebildung 31,56 Proz., für den Sauerstoffverbrauch 32 Proz. und für die Kalorienbildung 31,97 Proz., als aber dazu noch die Schilddrüse entfernt wurde, kam es nach der Adrenalininjektion zu einer sehr viel größeren Steigerung des Grundumsatzes und der Kalorienbildung. Sie bewirkte nämlich eine prozentische Steigerung der Kohlensäurebildung um 46,04 Proz., des Sauerstoffverbrauchs 42,82 Proz., der Kalorienbildung 42,23 Proz.

Es ist also wieder der Fall eingetreten, daß bei der doppelten Entfernung von Milz und Schilddrüse Anzeichen dafür vorliegen, daß namentlich die sonst so unfehlbare Schilddrüsenwirkung nicht zum Ausdruck kommt. Freilich erhält man diese Erscheinung durchaus nicht immer. Aber da sie doch bei den verschiedensten Versuchsanordnungen gelegentlich zum Vorschein kommen, Versuchsanordnungen, die in verschiedenen Arbeiten des Berner physiologischen Instituts mitgeteilt worden sind, wird man nicht umhin können, ihr eine gewisse Bedeutung beizumessen.

Zusammengefaßt, sind die Ergebnisse meiner Arbeit die nachfolgenden:

1. Wenn auf eine Schilddrüsenentfernung die Entfernung der Milz nachfolgt, so vermindert sich die stoffwechselsteigernde Wirkung der subkutanen Adrenalininjektion noch mehr als durch die bloße Schilddrüsenentfernung.

Tabelle XII. 9. Grupp

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g
					Die Versuche mit Adrenal		
1	20. X.	2,5	26	194,11	0,37	1,09	1,03
		4,0	26	191,94	0,39	1,77	1,68
2	22. X.	2,5	26	195,90	0,10	0,70	0,68
		4,0	26	194,46	0,30	1,78	1,65
3	24. X.	2,5	26	192,16	0,32	0,98	0,88
		4,0	26	189,01	0,27	1,82	1,64
4	27. X.	2,5	26	199,48	0,43	1,04	0,95
		4,0	26	195,44	0,27	1,73	1,61
5	29. X.	2,5	27	190,18	0,23	0,98	0,90
		4,0	26	188,06	0,94	1,89	1,77
6	31. X.	2,5	26	189,48	0,48	1,10	1,03
		4,0	26	187,16	1,19	1,79	1,70
7	3. XI.	3,0	27	196,16	0,32	1,12	1,06
		4,0	27	194,58	1,30	1,92	1,80
8	5. XI.	2,5	27	192,68	0,83	1,01	0,93
		4,0	27	189,23	1,19	1,83	1,68
				Die Versuche mit Adrenalin nach der Sch			
9	13. XI.	2,5	27	163,87	0,26	0,81	0,75
		4,0	27	162,07	0,60	1,50	1,34
10	18. XI.	3,0	27	177,99	0,37	1,04	0,99
		4,0	27	176,28	0,82	1,71	1,64
11	20. XI.	2,5	27	176,59	0,44	0,74	0,71
		4,0	28	175,00	0,84	1,76	1,66
12	22. XI.	3,0	27	177,84	0,31	0,87	0,87
		4,5	27	176,73	1,33	1,82	1,79
13	27. XI.	2,5	26	190,80	0,42	0,87	0,83
		4,0	26	187,14	1,18	1,72	1,57
14	1. XII.	2,5	26	182,26	0,17	0,74	0,74
		4,0	26	180,81	0,46	1,38	1,35
15	3. XII.	2,5	27	181,68	0,24	0,82	0,80
		4,0	27	180,72	0,39	1,43	1,37
16	5. XII.	2,5	27	187,00	0,21	0,76	0,72
		4,0	27	181,59	0,42	1,52	1,38

-chwanzgefärbte Ratte (Weibchen).

Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Kalorienbildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs Proz.	Steigerung der Kalorienbildung Proz.	Bemerkungen
or der Operation.							
0,769	2,246	2,123	7,20	—	—	—	Nüchtern
0,765	2,305	2,188	7,42	2,63	3,06	3,06	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,748	1,429	1,389	4,70	—	—	—	Nüchtern
0,748	2,288	2,121	7,17	53,10	52,72	52,51	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,809	2,040	1,832	6,26	—	—	—	Nüchtern
0,806	2,407	2,169	7,42	17,99	18,23	18,52	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,795	2,085	1,905	6,50	—	—	—	Nüchtern
0,781	2,213	2,060	7,07	6,14	8,14	8,77	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,791	2,061	1,893	6,45	—	—	—	Nüchtern
0,776	2,513	2,353	8,00	21,93	24,30	24,04	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,776	2,322	2,174	7,39	—	—	—	Nüchtern
0,765	2,391	2,271	7,71	2,97	4,46	4,33	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,768	1,903	1,801	6,11	—	—	—	Nüchtern
0,775	2,467	2,313	7,86	29,64	28,43	28,63	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,789	2,097	1,931	6,58	—	—	—	Nüchtern
0,791	2,418	2,220	7,56	15,31	14,97	14,90	0,1 mg Adrenalin subkutan
üsen- und Milzentfernung (7. XI. operiert).							
0,785	1,977	1,831	6,24	—	—	—	Nüchtern
0,813	2,314	2,067	7,07	16,28	12,89	13,31	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,763	1,948	1,854	6,28	—	—	—	Nüchtern
0,757	2,425	2,326	7,93	24,49	25,46	26,28	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,757	1,676	1,608	5,48	—	—	—	Nüchtern
0,770	2,514	2,371	8,05	49,99	47,44	46,86	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,725	1,631	1,631	5,49	—	—	—	Nüchtern
0,739	2,289	2,251	7,58	40,35	38,02	38,06	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,761	1,824	1,740	5,89	—	—	—	Nüchtern
0,796	2,298	2,097	7,16	25,99	20,52	21,55	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,725	1,624	1,624	5,47	—	—	—	Nüchtern
0,743	1,908	1,867	6,30	17,49	14,96	15,18	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,745	1,805	1,757	5,95	—	—	—	Nüchtern
0,758	1,978	1,895	6,42	9,58	7,84	7,89	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,767	1,626	1,540	5,23	—	—	—	Nüchtern
0,800	2,093	1,900	6,48	28,73	23,38	23,92	0,1 mg Adrenalin subkutan

Tabelle XIII. 9. Grupp

Versuchs-Nr.	Datum	Versuchsdauer	Temperatur im Kasten	Körpergewicht	H_2O-Bildung	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch
	1924	Std.	°C	g	g	g	g
					Die Versuche mit Adrenali		
1	14. X.	2,5	25	137,35	0,24	0,90	0,88
		4,0	26	136,54	0,58	1,62	1,62
2	16. X.	3,0	26	134,52	0,52	1,02	0,97
		4,0	26	133,55	0,69	1,46	1,36
3	21. X.	2,5	26	132,81	0,32	0,85	0,73
		4,0	26	132,08	0,25	1,53	1,44
4	23. X.	2,5	26	137,73	0,20	0,72	0,70
		4,0	26	137,73	0,20	1,39	1,30
5	26. X.	3,5	26	140,55	0,38	1,06	0,99
		4,0	26	139,86	0,37	1,73	1,67
6	30. X.	3,0	26	140,34	0,25	0,88	0,83
		4,0	26	139,10	0,45	1,75	1,64
7	1. XI.	2,0	26	141,88	0,14	0,61	0,58
		4,0	26	140,46	0,82	1,67	1,51
8	4. XI.	3,0	27	144,33	0,25	0,87	0,83
		4,0	27	141,81	0,60	1,66	1,57
9	6. XI.	2,5	27	141,54	0,34	0,73	0,71
		4,0	27	139,54	0,54	1,64	1,52
10	8. XI.	2,5	27	138,21	0,25	0,74	0,71
		4,0	27	136,21	0,53	1,65	1,52
				Die Versuche mit Adrenalin nach der Schi			
11	26. XI.	2,5	27	125,47	0,27	0,79	0,72
		4,0	27	122,87	0,50	1,41	1,26
12	29. XI.	2,0	27	130,85	0,24	0,59	0,53
		5,0	27	129,70	1,11	1,57	1,46
13	1. XII.	2,5	26	125,16	0,40	0,64	0,62
		4,0	26	133,89	0,54	1,16	1,06
14	3. XII.	2,5	27	129,10	0,29	0,62	0,62
		4,0	27	126,93	0,64	1,25	1,19
15	5. XII.	2,5	27	125,42	0,33	0,58	0,56
		4,0	27	124,88	0,44	1,12	0,94

…iße Ratte (Weibchen).

Respirationsquotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Kalorienbildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs Proz.	Steigerung der Kalorienbildung Proz.	Bemerkungen
…or der Operation.							
0,743	2,621	2,563	8,65	—	—	—	Nüchtern
0,725	2,966	2,966	9,99	13,16	15,73	15,50	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,764	2,528	2,404	8,14	—	—	—	Nüchtern
0,780	2,733	2,546	8,66	8,11	5,91	6,39	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,846	2,560	2,199	7,57	—	—	—	Nüchtern
0,772	2,896	2,726	9,25	13,13	23,97	22,18	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,747	2,091	2,033	6,87	—	—	—	Nüchtern
0,777	2,543	2,379	8,09	21,62	17,02	17,75	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,778	2,155	2,013	6,84	—	—	—	Nüchtern
0,753	3,092	2,985	10,09	43,48	48,30	47,50	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,770	2,090	1,971	6,69	—	—	—	Nüchtern
0,775	3,145	2,948	10,02	50,47	49,56	49,78	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,764	2,150	2,044	6,90	—	—	—	Nüchtern
0,803	2,922	2,688	9,17	35,91	31,51	32,79	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,761	2,009	1,917	6,20	—	—	—	Nüchtern
0,768	2,927	2,768	9,39	45,69	44,40	51,45	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,769	2,063	1,950	6,62	—	—	—	Nüchtern
0,784	2,938	2,723	9,26	42,41	39,64	39,90	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,757	2,142	2,055	6,96	—	—	—	Nüchtern
0,789	3,028	2,790	9,50	41,37	35,77	36,50	0,1 mg Adrenalin subkutan
…rüsen- und Milzentfernung (8. XI. operiert).							
0,797	2,519	2,295	7,83	—	—	—	Nüchtern
0,813	2,735	2,444	8,36	8,58	6,49	6,77	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,809	2,255	2,025	6,93	—	—	—	Nüchtern
0,781	2,421	2,251	7,65	7,36	11,16	10,39	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,750	2,045	1,982	6,70	—	—	—	Nüchtern
0,795	2,341	2,139	7,30	14,47	7,92	8,96	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,725	1,921	1,921	6,47	—	—	—	Nüchtern
0,763	2,462	2,344	7,94	28,16	22,02	22,72	0,1 mg Adrenalin subkutan
0,752	1,850	1,786	6,04	—	—	—	Nüchtern
0,866	2,242	1,882	6,51	21,19	5,38	7,79	0,1 mg Adrenalin subkutan

Tabelle XV. 8. Gruppe. Schwanzgeschnittene Ratte (Männchen). Milzloses Tier.

Versuchs-Nr.	Datum 1924	Versuchs-dauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Körper-gewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g	Respirations-quotient	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Kalorien-bildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs Proz.	Steigerung der Kalorien-bildung Proz.	Bemerkungen
					Die Versuche mit Adrenalin vor der Schilddrüsenentfernung.										
1	10. XI.	2,5	26	222,82	0,30	1,23	1,17	0,704	2,208	2,100	7,11	—	—	—	Nüchtern
		4,0	26	219,47	0,92	2,69	2,58	0,757	3,064	2,939	9,95	38,77	39,95	39,93	0,15 mg Adrenalin subkutan
2	12. XI.	2,5	27	210,63	0,42	1,09	1,01	0,784	2,070	1,918	6,50	—	—	—	Nüchtern
		4,0	27	209,11	0,48	2,00	1,95	0,745	2,391	2,331	7,88	15,51	21,53	21,24	0,15 mg Adrenalin
3	14. XI.	2,5	27	206,32	0,12	0,93	0,88	0,768	1,803	1,706	5,79	—	—	—	Nüchtern
		4,0	28	203,14	0,83	2,05	1,90	0,784	2,523	2,338	7,95	39,93	37,04	37,31	0,15 mg Adrenalin
4	17. XI.	2,5	27	184,35	0,18	0,98	0,93	0,766	2,126	2,018	6,85	—	—	—	Nüchtern
		4,0	27	180,47	0,95	2,19	2,08	0,765	3,034	2,881	9,78	42,76	42,77	42,79	0,15 mg Adrenalin
5	19. XI.	2,5	27	174,45	0,37	1,10	1,05	0,761	2,522	2,408	8,15	—	—	—	Nüchtern
		4,0	27	172,32	0,55	2,10	1,97	0,774	3,047	2,858	9,70	20,82	18,69	18,58	0,15 mg Adrenalin
					Die Versuche mit Adrenalin nach der Schilddrüsenentfernung (22. XI. operiert).										
6	26. XI.	2,5	27	169,66	0,20	0,82	0,77	0,774	1,933	1,815	6,16	—	—	—	Nüchtern
		4,0	27	167,74	0,97	2,09	1,94	0,783	3,115	2,891	9,83	61,14	59,27	59,60	0,15 mg Adrenalin
7	29. XI.	2,0	27	170,85	0,12	0,67	0,61	0,798	1,961	1,785	6,09	—	—	—	Nüchtern
		5,0	27	169,34	0,93	2,46	2,28	0,786	2,905	2,687	9,15	48,14	50,53	50,23	0,15 mg Adrenalin
8	1. XII.	2,5	26	174,08	0,17	0,79	0,74	0,776	1,815	1,700	5,78	—	—	—	Nüchtern
		4,0	27	172,49	0,39	1,78	1,74	0,743	2,576	2,518	8,49	41,92	48,11	46,88	0,15 mg Adrenalin
9	3. XII.	2,5	27	175,05	0,27	0,72	0,70	0,747	1,645	1,600	5,41	—	—	—	Nüchtern
		4,0	27	173,92	0,57	1,54	1,36	0,823	2,214	1,955	6,70	34,59	22,19	23,86	0,15 mg Adrenalin
10	5. XII.	2,5	27	179,37	0,23	0,70	0,67	0,759	1,561	1,494	5,06	—	—	—	Nüchtern
		4,0	27	178,56	0,79	1,61	1,43	0,818	2,254	2,002	6,86	44,39	34,00	35,57	0,15 mg Adrenalin

Tabelle XIV. Zusammengefaßte Ergebnisse 7.

9. Gruppe. Weiße Ratte (Weibchen).

Versuchsarten	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Respirationsquotient	Kalorienbildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs Proz.	Steigerung der Kalorienbildung Proz.	Bemerkungen
Ruheumsatz	2,241	2,115	0,770	7,14	—	—	—	
Nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan) . . .	2,939	2,752	0,776	9,34	31,54	31,18	31,97	Vor der Operation
Ruheumsatz	2,118	2,002	0,769	6,79	—	—	—	
Nach der Injektion von 0,1 mg Adrenalin (subkutan) . . .	2,440	2,212	0,801	7,55	15,95	10,79	11,33	Nach Entfernung der Milz und der Schilddrüse

Tabelle XVI. Zusammengefaßte Ergebnisse 8.

8. Gruppe. Schwanzgeschnittene Ratte (Männchen).

Versuchsarten	CO_2-Bildung pro kg und Stunde g	O_2-Verbrauch pro kg und Stunde g	Respirationsquotient	Kalorienbildung pro kg und Stunde Cal	Steigerung der CO_2-Bildung Proz.	Steigerung des O_2-Verbrauchs Proz.	Steigerung der Kalorienbildung Proz.	Bemerkungen
Ruheumsatz	2,146	2,030	0,768	6,88	—	—	—	
Nach der Injektion von 0,15 mg Adrenalin (subkutan) . . .	2,812	2,669	0,769	9,05	31,56	32,00	31,97	Vor der Operation (milzlos)
Ruheumsatz	1,783	1,679	0,771	5,70	—	—	—	
Nach der Injektion von 0,15 mg Adrenalin (subkutan) . . .	2,613	2,411	0,784	8,21	46,04	42,82	43,23	Nach der Schilddrüsenentfernung (milz- und schilddrüsenlos)

2. Die ausschließliche Entfernung der Milz kann die Anspruchsfähigkeit des Organismus auf Adrenalin herabsetzen, muß es aber nicht.

3. Wird Milz und Schilddrüse in einer Sitzung entfernt, so erhält man verschiedene Resultate; die einen bestehen darin, daß ganz deutlich die umsatzsteigernde Wirkung von Adrenalin gegen die Norm erhöht ist, während in anderen Fällen keine Steigerung, sondern eine Verminderung eintritt. Diese Verschiedenheit mag darauf beruhen, daß die Entfernung der Milz in gewissen Fällen eine Überwertigkeit aller Organe hervorrufen kann, in gewissen anderen Fällen aber das Gegenteil bewirkt, wofür Analogien aus anderen Untersuchungen vorliegen.

4. Auch wenn zuerst die Milz und dann die Schilddrüse entfernt wird, kann es zu einer merklichen Wirkungssteigerung der subkutanen Adrenalininjektion auf den respiratorischen Grundumsatz kommen.

Studien über intermediären Kohlenhydratumsatz an der Leber.

VIII. Mitteilung:

Phosphatase und Phosphatese der Hexosediphosphorsäure in der Leber unter Berücksichtigung des Insulins.

Von

Theodor Brugsch und **Hans Horsters.**

(Aus der II. medizinischen Klinik der Charité.)

(Eingegangen am 9. Januar 1925.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

I. Teil.

Die Leberphosphatase der Hexosediphosphorsäure.

In unserer sechsten Mitteilung[1]) (Über die Zwischenzucker in Leber und Muskulatur) hatten wir gezeigt, daß die in Leber und Muskulatur, besonders reichlich unter Insulineinwirkung, auffindbaren Zwischenzucker zu einem kleinen Teile aus phosphoryliertem Kohlenhydrat bestehen, zu einem größeren Teile aus Polysacchariden, die nach Aufspaltung linksdrehende Zucker (neben rechtsdrehenden) ergaben. Wir haben den Vorgang der Glykogensynthese aus der Glykose infolgedessen durch folgendes Schema veranschaulicht.

Glucose
↓
Gekoppelte Reaktion { Milchsäure → CO_2
↓ + Phosphorsäure
d-Fructosediphosphorsäure }
↓
Komplex von { d-Fructose + Glucose } + Phosphorsäure
↓
Glykogen

} Aktivierung durch Insulin

Es galt nunmehr, diesen Prozeß im einzelnen weiter zu verfolgen, wobei das Hauptmoment zunächst auf die Hexosediphosphorsäure gelegt werden mußte.

---

[1]) Diese Zeitschr. 151, Heft 3/4, 1924.

Die Hexosediphosphorsäure ist bekanntlich 1905 von *A. Harden* und *W. I. Young*[1]) als intermediäres Reaktionsprodukt beim Gärvorgang entdeckt worden, was von den Autoren durch folgende Gleichung ausgedrückt worden ist:

$$2C_6H_{12}O_6 + 2R'_2HPO_4 = 2CO_2 + 2C_2H_6O + C_6H_{10}O_4(PO_4R'_2)_2 + 2H_2O.$$

C. Neuberg, E. Färber, A. Levite und *E. Schwenk*[2]) wiesen sodann nach, daß der Zucker der Hexosediphosphorsäure Fructose ist, allerdings konnten später *C. Neuberg* (l. c., S. 2) und *H. Euler*[3]) zeigen, daß der Gärungsvorgang nicht allenthalben über die Hexosediphosphorsäure verläuft, sondern daß es eine ganze Klasse typischer Hefen, nämlich die obergärigen, gibt, die regelrecht vergären, aber nicht nachweisbar Fructosediphosphorsäure bilden; das gilt nach *Neuberg* zum mindesten auch für eine Anzahl Unterhefen.

Für den tierischen Organismus hat *Embden* mit seinen Mitarbeitern die Bedeutung der Fructosediphosphorsäure — des *Embden*schen Lactacidogens — erhellt. *Embden, Griesbach* und *Schmitz*[4]) waren auf Grund von Versuchen am Preßsaft frischer Hundemuskeln zu der Ansicht gekommen, daß die im Preßsaft auftretende Milchsäurebildung unter fermentativer Spaltung eines hexosephosphorsäureartigen Komplexes erfolgt, dann konnten *Embden* und *Laquer*[5]) zeigen, daß man aus frischen Muskelextrakten mit Baryt neben Phosphorsäure und neben einer bis dahin unbekannten Nucleinsäure eine Substanz ausfällen kann, welche einen reduzierenden Kohlenhydratkomplex und daneben organisch gebundene Phosphorsäure enthält [von *Embden, Kalberlah* und *Engel*[6]) Lactacidogen genannt]. Dann zeigten Untersuchungen von *Embden, Griesbach* und *Laquer*[7]), daß der Abbau der Sechs-Kohlenstoffzucker in der Muskulatur und allem Anschein nach auch in anderen tierischen Organen nur unter intermediärer Bindung an Phosphorsäure erfolgen kann, womit eine weitgehende Analogie zwischen dem Hauptabbauvorgang der Kohlenhydrate im tierischen Organismus und den Abbauvorgängen bei der Hefegärung zutage trat. Den Schlußstein bildeten die Untersuchungen von *Embden* und *Laquer*[8]), die zeigten, daß das sogenannte Lactacidogen der Muskulatur identisch mit der Hexosediphosphorsäure der Hefe ist.

Weiter zeigten dann Untersuchungen von *Embden, Schmitz* und *Meinecke*[9]), daß die Hexosediphosphorsäure in der Muskulatur durch Muskelarbeit stark vermindert wird, woraus sie den Schluß zogen, daß das Lactacidogen die Tätigkeitssubstanz des quergestreiften Muskels ist. So fand *Embden*[10]) auch, daß der rascher arbeitende weiße Kaninchenmuskel reicher an Lactacidogen ist als der ausdauernde rote. Danach

---

[1]) Proc. of the Chem. Soc. **21**, 189, 1905; **24**, 115, 1908; Proc. Roy. Soc. B. **77**, 417, 1906; **80**, 299, 1908; **81**, 336, 1909; diese Zeitschr. **32**, 172, 1911.

[2]) Diese Zeitschr. **83**, 244, 1917; **103**, 320, 1920.

[3]) Ebendaselbst **86**, 338, 1918.

[4]) H. S. **93**, 1, 1914.

[5]) H. S. **93**, 94, 1914.

[6]) Diese Zeitschr. **45**, 45, 1912.

[7]) H. S. **93**, 124, 1914.

[8]) H. S. **113**, 1, 1921.

[9]) H. S. **113**, 10, 1921.

[10]) Med. Klinik **19**, 732, 1919.

sei also gewissermaßen das Lactacidogen der Ausdruck für den Zustand erhöhter Arbeitsbereitschaft; das Muskelglykogen sei nur eine Reserve für das Lactacidogenkohlenhydrat, die eigentliche Betriebssubstanz aber das Lactacidogen. „Der Umstand, daß Phosphorsäure im Säugermuskel nur dann frei wird oder, richtiger gesagt, frei bleibt, wenn keine erheblichen Kohlenhydratbestände mehr zur Verfügung stehen, erfährt seine ungezwungenste Deutung durch die Annahme, daß in Gegenwart von Kohlenhydrat die Phosphorsäure immer wieder durch einen synthetischen, assimilatorischen Prozeß gebunden wird" [*E. Schmitz*[1])].

So wird denn die Phosphorsäure zum Mittel, um jeweils das Lactacidogen zur Arbeitsbereitschaft im *Embden*schen Sinne zu bilden.

Man hat nun weiter die Frage untersucht, wie verhält sich der tierische Organismus gegenüber der Hexosediphosphorsäure? So fanden z. B. *Euler* und *Funcke*[2]) nach Verabreichung von Calciumhexosediphosphat per os bei Kaninchen eine Aufspaltung, indem die Phosphorsäure zum größten Teile als anorganische Phosphorsäure im Harne wieder erschien, ferner fanden sie, daß der Glycerinextrakt der Darmschleimhaut aus der Hexosephosphorsäure Phosphorsäure abspaltet; das gleiche bewirkt der Darm des Schweines [*Euler*[3])]. Nach *Hagemann*[4]) spaltet auch Uteruspreßsaft, Nieren- und Hodenpreßsaft Lactacidogen.

Tomita[5]) studierte die Spaltung der tierischen Organe für Hexosemonophosphorsäure, die nach *Neuberg*[6]) durch partiellen Abbau der Hexosediphosphorsäure erhalten werden kann; *Tomita* fand bei Kalt- und Warmblütern ein Spaltungsvermögen der Organe, besonders stark in der Niere, am schwächsten in der Muskulatur. *Takahashi*[7]) und *Forai*[8]) untersuchten das Spaltungsvermögen für Hexosemono- und für Hexosediphosphorsäure menschlicher Organe und fanden ein solches in allen untersuchten Organen: Leber, Muskel, Schilddrüse, Darm, Blut, Nebenniere, Uterus, Hoden und im Carcinomgewebe.

Danach darf es also als gesichert anzunehmen sein, daß die Organe des Warmblüters gegenüber der Hexosediphosphorsäure ein enzymatisches Spaltungsvermögen besitzen. Dieses Enzym soll als Phosphatase bezeichnet werden. Wir haben nun zunächst die Phosphatase an der Leber von Hunden im Durchströmungsversuch studiert.

Phosphataseversuch an der normalen Hundeleber.

Versuch 4.

Ein gut genährter Hund wird durch Carotisschnitt völlig entblutet und die Leber herauspräpariert.

Die Leber wird mit 1 Liter Ringerlösung mit 0,1 proz. Glucose, der 1 g Hexosediphosphorsäure als Natriumsalz zugesetzt worden ist, im

---

[1]) Klin. Wochenschr. **1**, Nr. 9, S. 432, 1922.
[2]) H. S. **77**, 488, 1912.
[3]) H. S. **79**, 375, 1912.
[4]) H. S. **93**, 54, 1914.
[5]) Diese Zeitschr. **131**, 170, 1923.
[6]) Ebendaselbst **88**, 432, 1918.
[7]) Ebendaselbst **145**, 178, 1924; **146**, 161, 1924.
[8]) Ebendaselbst **145**, 47, 1924.

Verlauf von 1 Stunde 40 Minuten bei 38° C durchblutet. Nach jeder Durchblutung wird eine Stichprobe der Durchblutungsflüssigkeit auf den Reduktionswert (nach *Folin-Wu*) und auf den Polarisationswert untersucht, ferner die anorganische Phosphorsäure nach *Embden* bestimmt[1]).

Gehalt der Ringerlösung (Proz.) an anorganischer H_3PO_4 = 0,0, Reduktionswert (berechnet auf Glucose) = 0,161, Drehung (2-dm-Rohr) = + 0,14°.

Durchblutungsversuch.

Häufigkeit der Durchblutung	Zeit der Durchblutung nach Beginn	Reduktionswert berechnet auf Glucose Proz.	Drehungswert im 2-dm-Rohr	Anorganische H_3PO_4 mg-Proz.
1 ×	20′	0,140	+ 0,14°	6,8
2 ×	40	0,156	+ 0,14	5,6
3 ×	60	0,179	+ 0,18	5,4
5 ×	100	0,235	+ 0,26	14,8
7 ×	140	0,250	+ 0,3	18,8

Die Leber (nach einer Analyse von 10 g Leber) enthielt vor der Durchströmung 3,3 Proz. Glykogen, nach der Durchströmung 2,7 Proz. Glykogen.

Diskussion der Resultate.

Eine Spaltung der Hexosediphosphorsäure hat stattgefunden, und zwar zunehmend unter Freimachung bis zu 188 mg anorganischen H_3PO_4 aus 1 g hexosediphosphorsaurem Natrium. Nehmen wir rund 400 mg anorganische H_3PO_4 als maximalspaltbare Menge an, so wären das 47 Proz. Linksdrehender Zucker ist technisch nicht nachweisbar, da gleichzeitig eine starke Zuckerausschüttung von rechtsdrehendem Zucker erfolgt (siehe Reduktions- und Polarisationswerte); dementsprechend hat auch die Leber einen Verlust von 0,6 Proz. Glykogen aufzuweisen.

Nachdem wir die Spaltung der Hexosediphosphorsäure durch die normale Leber bestätigt hatten, sind wir zunächst dazu übergegangen, die Phosphatase an der Leber eines pankreopriven Hundes zu studieren, einmal ausgehend von der Vorstellung, daß die Phosphatase im intermediären Kohlenhydratumsatz auch durch das Pankreas abgestimmt sein muß, sodann auch in der Erwartung, bei einer glykogenarmen Leber, wie sie dem pankreasdiabetischen Hunde zukommt, eventuell den Nachweis der Spaltung der Hexosediphosphorsäure in anorganische Phosphorsäure und linksdrehenden Zucker erbringen zu können.

Phosphataseversuche an der Leber eines pankreopriven Hundes.

Versuch 1. 10. Juli 1924.

Einem Hunde im Gewicht von 3,5 kg wird am 7. Juli 1924 das Pankreas total exstirpiert.

[1]) Vgl. unsere Methodik im einzelnen in unserer ersten Mitteilung, diese Zeitschr. **147**, Heft 1/2, 1924.

Am 8. Juli kein Harn.

Hunger { Am 9. Juli 480 ccm Urin, dreht 1,43° = 2,7 Proz. = 12,96 g Tageszucker.
Am 10. Juli 375 ccm Urin, dreht 1,25° = 2,36 Proz. = 8,85 g Tageszucker. }

Tötung des Hundes am 10. Juli durch Entblutung aus den Carotiden.

Durchblutung der Leber bei 38° C mit Ringerlösung und 0,1 Proz. Glucose, der 0,1 Proz. hexosediphosphorsaures Natrium zugesetzt wurde. Nach jedesmaliger Durchblutung wurde eine Stichprobe zur Analyse entnommen.

Polarisationswert der Ringerlösung vor der Durchblutung = + 0,12; Reduktionswert 0,147 Proz. (berechnet auf Glucose); Gehalt an anorganischer H_3PO_4 = 0,0.

Durchblutungsversuch.

Häufigkeit der Durchblutung	Zeit der Durchblutung nach Beginn	Reduktionswert, berechnet auf Glucose Proz.	Drehungswert im 2-dm-Rohr	Anorganische H_3PO_4 mg-Proz.
1 ×	10′	0,155	+ 0,08°	3,5
2 ×	20	0,161	+ 0,10	3,7
3 ×	40	0,160	+ 0,08	5,0
5 ×	100	0,154	+ 0,02	6,8
7 ×	140	0,179	+ 0,02	9,8

Diskussion der Resultate.

Eine Spaltung der Hexosediphosphorsäure hat stattgefunden, wenn sie auch hier geringer als im vorigen Versuch zu sein scheint (statt 188 mg dort, hier nur 98 mg anorganischer H_3PO_4 aus rund 400 mg anorganischer H_3PO_4 der Hexosediphosphorsäure, das sind rund 25 Proz.). Die Abnahme der Rechtsdrehung ist nur auf Freiwerden linksdrehender Zucker zurückzuführen, so daß die Annahme hier berechtigt ist, daß Hexosediphosphorsäure in Fructose und anorganische H_3PO_4 gespalten worden ist.

Es hat also auch die pankreoprive Leber eine wirksame Phosphatase der Hexosediphosphorsäure, auch wenn diese möglicherweise ein geringeres Ausmaß an Wirkung zeigt, als bei der gesunden Leber. Die Aufspaltung geschieht in d-Fructose und anorganische H_3PO_4.

Wir haben nun diese Versuche wiederholt.

Versuch 2.

Einem Hunde von etwa 4 kg Gewicht wird am 18. Juli 1924 das Pankreas total exstirpiert. Am 20. Juli frißt das Tier wieder. Harnmenge vom 20. und 21. Juli beträgt 1400 ccm, reduziert stark; dreht + 2,73° = 4,78 Proz. Glucose oder 67 g Gesamtzucker. Am 23. Juli ist der Harn und Kot vermengt, am 24. Juli erbricht das Tier. Starke Zuckerausscheidung am 24. und 25. Juli.

Am 25. Juli wird das Tier durch Carotisschnitt entblutet. Ein Leberlappen von 40 g wird abgebunden und zur Gasanalyse wie chemischen Analyse verarbeitet, die übrige Leber durchblutet mit Ringerlösung, die auf 1 Liter 1 g Hexosediphosphorsäure als Natriumsalz enthält.

Reduktionswert der Ringerlösung nach *Folin-Wu* (berechnet auf Glucose) = 0,138 Proz., Drehungswert (im 2-dm-Rohr) = 0,12 Proz., anorganische H_3PO_4 = 0,0.

Durchblutungsversuch.

Häufigkeit der Durchblutung	Zeit der Durchblutung nach Beginn	Reduktionswert, berechnet auf Glucose Proz.	Drehungswert im 2-dm-Rohr	Anorganische H_3PO_4 mg-Proz.
3 ×	60′	0,156	+ 0,09°	2,4
6 ×	120	0,134	+ 0,04	6,6

Gleichzeitig wurde hier der Zuwachs an Milchsäure bestimmt (nach der Methode von *Clausen-Meyerhof*), der nach 60 Minuten 23,2 mg-Proz., nach 120 Minuten 30,8 mg-Proz. beträgt.

Diskussion der Resultate.

Auch hier hat eine Spaltung der Hexosediphosphorsäure in anorganische H_3PO_4 (66 mg von rund 400 mg = 17 Proz.) und in linksdrehenden Zucker (Abnahme der Rechtsdrehung) stattgefunden. Andererseits ist aber ein erheblicher Zuwachs an Milchsäure eingetreten, und zwar beträgt dieser auf 1 Liter Ringerflüssigkeit, berechnet nach 120 Minuten, bereits 76 mg. Dieser kann unmöglich aus der Hexosediphosphorsäure hergeleitet sein, sondern mußte aus der Leber selbst stammen, und in der Tat ließ sich nachweisen, daß der Milchsäuregehalt in dem Preßsaft der Leber vor der Durchströmung (berechnet auf 100 g Substanz) 145 mg, nach der Durchströmung nur noch 55 mg betrug, daß ferner die Leber an reduzierenden Substanzen vor der Durchströmung 2,25 Proz., auf Glucose berechnet, nach der Durchströmung nur noch rund 1,8 Proz., auf Glucose berechnet, enthielt. Der Gehalt an anorganischer H_3PO_4 hatte sich in der Leber nach der Durchströmung nicht vermehrt, er betrug 50 mg pro 100 g Leber). Der Glykogengehalt der Leber blieb vor und nach der Durchblutung bei 0,36 Proz.

Zusammenfassend kann man auch für diese pankreoprive Leber das Vorhandensein einer Phosphatase der Hexosediphosphorsäure annehmen, die diese in Fructose und anorganische H_3PO_4 spaltet, während die Zunahme an Milchsäure sich ungezwungen aus intermediären Milchsäure bzw. Zuckervorräten der Leber herleiten läßt. Diese Tatsache erscheint uns von ganz besonderer Bedeutung, weil damit die Bedeutung der Phosphatase, wie noch auseinandergesetzt werden soll, in ein besonderes Licht gerückt wird.

Es lag natürlich nahe, der Frage nachzugehen, wie verhält sich die Leber eines pankreopriven Hundes gegenüber der Hexosediphosphorsäure bei gleichzeitiger Insulinzufuhr, ferner die insulingespeicherte normale Leber.

Wir haben zwei dementsprechende Versuche durchgeführt.

Phosphataseversuch an der Leber eines pankreopriven Hundes bei gleichzeitiger Insulinspeicherung.

Versuch H. Journal III, 22.

Einem Hunde wird am 24. November 1924 das Pankreas total exstirpiert, nachdem ihm bereits am 10. November eine Pankreasfistel zur Untersuchung der äußeren Funktion des Pankreas angelegt worden war. Diese Fistel hatte fast bis zum Tage der Operation gut funktioniert. Harnmenge vom 30. November bis 1. Dezember = 3000 ccm. Harnzucker 3,32 Proz. Gesamte Zuckermenge zweier Tage 99,6 g.

Das Tier erholte sich von der Operation auffallend schnell, wurde aber am 3. Dezember, da es sehr schwach wurde, durch Carotisschnitt entblutet. [Von diesem Tiere wurde ein Stück der Leber vor der Pankreasexstirpation (24. November) und am Tage des Todes (3. Dezember) zur histologischen Untersuchung entnommen.] Ein Teil der Leber wurde abgebunden und der intermediäre Stoffwechsel an der Leber-Ringeraufschwemmung studiert, die Hauptmenge der Leber wurde zum Durchströmungsversuch mit Ringerlösung (mit 0,2 Proz. Glucose), der 1 g hexosediphosphorsaures Natrium zu 1 Liter zugesetzt wurde, verwandt.

Durchblutungsversuch mit Insulinzusatz.

Häufigkeit der Durchblutung	Anorganische H_3PO_4 mg-Proz.	Drehungswert im 2-dm-Rohr	p_H
1 ×	3	+ 0,18°	5,4
3 ×	3	+ 0,21	5,0
5 ×	5	+ 0,16	5,2
7 ×	8	+ 0,06	—

Die Durchblutungsflüssigkeit, *der 20 Einheiten Insulin (= 1 ccm von Burroughs & Welcome)* zugesetzt worden waren (sie enthielt statt 0,1 0,2 g Glucose!), drehte + 0,22; der Reduktionswert war nicht bestimmt worden. Der p_H-Wert betrug 6,9.

Der Glykogengehalt der Leber betrug vor der Durchblutung, für 100 g berechnet, 0,1 g, nach der Durchblutung 0,15 g.

Diskussion der Resultate.

Die Insulinzufuhr hat die Abspaltung von Phosphorsäure nicht verhindert. Es wurden (von etwa 400 mg der anorganischen H_3PO_4 in 1 g hexosediphosphorsaurem Natrium) 80 mg = 20 Proz. etwa abgespalten. Der Drehungswert des Zuckers nimmt ab, was sowohl ausgedeutet werden kann als Auftreten linksdrehender Zucker (Fructose bzw. Fructosekomplexe), wie als Verschwinden von Zucker. In diesem Sinne ließe sich die Zunahme des Glykogens in der Leber von 0,1 auf 0,15 Proz. ausdeuten. (Wegen der Wichtigkeit dieses letzten Befundes sollen Versuche in dieser Richtung später weitergeführt werden.) *Jedenfalls unterbricht das Insulin die Phosphatase nicht.*

Phosphataseversuche an der Leber eines insulinisierten Tieres im hypoglykämischen Komplex.

Wir haben schließlich noch die Durchblutungsversuche an einem Hunde vorgenommen, der durch Insulin in einen hypoglykämischen Komplex versetzt worden war.

Versuch 5. 31. Juli 1924.

Ein Gallenfistelhund, der 8 Wochen im Versuch gestanden hatte, erhält 9 Uhr vormittags 20 Einheiten Insulin Norgine und bekommt gegen 11 Uhr deutliche hypoglykämische Erscheinungen (einzelne klonische Zuckungen); darauf Tötung durch Entblutung aus der Carotis.

Die Leber, von der ein Stück zum Studium des Gaswechsels verwandt wurde, wird durchströmt mit Ringerlösung, der 1 g hexosediphosphorsaures Natrium und 10 Einheiten Insulin (Norgine) zugesetzt worden waren. Die Ringerlösung enthielt 0,1 Proz. Glucose.

Durchblutungsversuch.

Häufigkeit der Durchblutung	Zeit der Durchblutung nach Beginn	Zuckergehalt nach *Folin-Wu*, berechnet auf Glucose Proz.	Drehungswert im 2-dm-Rohr	Anorganische H_3PO_4 mg-Proz.
3 ×	60′	0,117	+ 0,14°	12
7 ×	140	0,125	+ 0,14	12

Die Durchblutungsflüssigkeit ergab einen Drehungswert von + 0,12, Reduktionswert von 0,161, Glykogengehalt der Leber vor der Durchblutung 0,16 Proz., nach der Durchblutung 0,06 Proz.

Diskussion der Resultate.

Es wurden, für 1 Liter der Lösung berechnet, 120 mg anorganische H_3PO_4 abgespalten, d. h. etwa 30 Proz. von etwa 400 mg der organisch gebundenen H_3PO_4 der Hexosediphosphorsäure. Linksdrehender Zucker läßt sich nicht nachweisen, im Gegenteil hat der Drehungswert nach der +-Richtung zugenommen, dagegen der Reduktionswert der Lösung sich vermindert. Auch der Glykogengehalt der Leber hat abgenommen. *Auch hier hat also Insulinisierung bis zum hypoglykämischen Komplex die Phosphatasewirkung nicht gehindert.*

Fassen wir nun alle unsere Ergebnisse zusammen, indem wir die Versuche untereinander vergleichen, was wir durchaus tun können in Anbetracht der Tatsache, daß wir annähernd immer gleich große Lebermengen zur Durchströmung verwandten, die Durchströmungszeit auf etwa 1 Stunde und 40 Minuten ausdehnten, 1 Liter Ringerlösung mit 0,1 Proz. Glucose (bis auf eine Ausnahme) und 1 g hexosediphosphorsaures Natrium verwandten, so ergibt sich folgendes Bild.

Versuchstier: Hund, Organ: Leber.

Zustand des Tieres	Abspaltung von H_3PO_4 Proz.	Abspaltung von Zucker?	Zu- oder Abnahme des Glykogengehaltes der Leber?
Normal	47	Linksdrehender Zucker nicht nachweisbar infolge Ausschüttung rechtsdrehender Zucker	Abnahme
Pankreasdiabetischer Hund	25	Ja Linksdrehender Zucker	—
Pankreasdiabetischer Hund	17	Ja Linksdrehender Zucker	gleich
Pankreasdiabetischer Hund. Zusatz von Insulin zur Durchströmungsflüssigkeit	20	Ja Linksdrehender Zucker	Zunahme
Gallenfistelhund in hypoglykämischem Komplex. Zusatz von Insulin zur Durchströmungsflüssigkeit	30	Linksdrehender Zucker nicht nachweisbar infolge Ausschüttung rechtsdrehender Zucker	Abnahme

Wir lassen es zunächst noch dahingestellt sein, ob etwa durch die Pankreasexstirpation die Phosphatasewirkung der Leber geschädigt wird, denn erstens liegen die Werte nicht so verschieden von der Norm, sodann erhöht Insulinzusatz zur Durchströmungsflüssigkeit bei der Leber pankreopriver Hunde nicht die Phosphatasewirkung; *wohl aber kann man bei den pankreopriven Lebern, die keine Glucose wie die gesunde Leber ausschütten, da sie glykogenarm sind, die Spaltung der Hexosediphosphorsäure in anorganische Phosphorsäure und linksdrehenden Zucker zeigen.*

Wir führen hier nur noch zwei Versuche an, die an Lebern thyreopriver Hunde in Durchströmungsversuchen mit Hexosediphosphorsäure gewonnen sind und die uns in mancher Beziehung noch eine Klärung der Phosphatasewirkung zu geben imstande sind.

Versuch G. Journal III, 10.

Ein 8 kg schwerer Hund wird am 24. November thyreoidektomiert mit Erhaltung der Epithelkörperchen. Am 1. Dezember zeigt sich das Tier bei normaler Ernährung sehr geschwächt. Nach der Tötung am 1. Dezember wird die sofort entnommene Leber, von der ein Teil zur Erforschung des intermediären Umsatzes abgetrennt ist, lebenswarm bei 38° C mit 1 Liter Ringerlösung (mit 0,1 Proz. Glucose), nachdem 1 g hexosediphosphorsaures Natrium zugesetzt worden ist, durchblutet.

Durchblutungsversuch.

Häufigkeit der Durchblutung	Zeit der Durchblutung nach Beginn	Reduktionswert nach *Folin-Wu*, berechnet auf Glucose mg-Proz.	Drehungswert im 2-dm-Rohr	Anorganische H_3PO_4 mg-Proz.	p_H
1 ×	20′	128	+ 0,28°	11	6,7
3 ×	60	121	+ 0,20	30	6,6
5 ×	100	123	+ 0,12	26	6,3
7 ×	140	125	+ 0,12	36	6,4

Der Drehungswert der Ringerlösung vor der Durchblutung betrug + 0,12°, der Reduktionswert 153 mg-Proz.

Der Glykogengehalt der Leber vor der Durchblutung = 2 Proz., nach der Durchblutung = 1,2 Proz.

Diskussion der Resultate.

Hier ist eine so gut wie vollständige Aufspaltung der Hexosediphosphorsäure erreicht (360 mg von etwa 400 mg). Der Drehungswert der Durchströmungsflüssigkeit nimmt nach starker Zunahme bei der ersten Durchströmung allmählich wieder auf den ursprünglichen Wert ab, der Reduktionswert hält sich von der ersten Durchströmung an auf gleichem Niveau.

Da man von der dritten Durchströmung an eine fast vollständige Aufspaltung der Hexosephosphorsäure annehmen darf, so ist es erlaubt, aus den Drehungs- und Reduktionswerten den Anteil an d-Fructose zu berechnen, auf den man wegen der Abnahme des Drehungswertes schließen könnte. Die Berechnung geschieht nach folgender Formel (b = Grad der Drehung, a = Gramm Glucosen in 100 ccm, x = Glucose, $a - x$ = Fructose):

$$b = \frac{x}{0{,}952} - \frac{a-x}{0{,}538}$$

und hieraus

$$x = \text{Glucose} = \frac{0{,}5122 \,.\, b + 0{,}952 \,.\, a}{1{,}49}\ \text{g in 100 ccm},$$

$$a - x = \text{Fructose}.$$

Wir finden für die dritte Durchströmung Fructose 0,0 mg, Glucose 121 mg; für die fünfte Durchströmung Fructose 2 mg, Glucose 123 mg; für die siebente Durchströmung Fructose 5 mg, Glucose 125 mg.

Das Resultat ist, daß trotz der Abnahme der Drehung nur unverhältnismäßig kleine Fructosemengen in der Durchströmungsflüssigkeit auffindbar sind. Das spricht dafür, daß die Fructose, sofern sie nicht in der Leber zurückgehalten sein sollte, entweder in Milchsäure oder in Glucose umgewandelt sein muß. Andererseits zeigt die

Leber eine Abnahme des Glykogengehalts um 0,8 Proz., was darauf hinweist, daß (schon bei der ersten Durchströmung, wie die Zunahme des Drehungswertes zeigt!) die Leber Glucose ausgeschwemmt hat. Ein zweiter Versuch an einem thyreopriven Hunde, den wir hier anführen, kann in dieser Beziehung weitere Klärung bringen.

Versuch F. Journal II, 109. 6. Oktober 1924.

Einem Hunde wird am 26. September 1924 die Schilddrüse exstirpiert. Der Hund frißt nur mäßig, magert stark ab und wird hinfällig.

6. Oktober Entblutung durch die Carotiden.

Die Leber wird lebenswarm, nach Abbindung eines Lappens, der zur Erforschung des intermediären Leberstoffwechsels dient, mit Ringerlösung bei 38° C durchströmt. Die Ringerlösung enthält 0,1 Proz. Glucose und für das Liter, das zur Durchströmung benutzt wird, 1 g hexosediphosphorsaures Natrium.

Durchströmungsversuch.

Häufigkeit der Durchströmung	Zeit von der ersten Durchströmung ab	Reduktionswert, berechnet als Glucose mg-Proz.	Anorganische H_3PO_4 mg-Proz.	Milchsäure mg-Proz.
2 ×	40'	125	16	2,4
4 ×	80	73	40	4,0
6 ×	120	74	33	21,6

Diskussion der Resultate.

Die Zerlegung der Hexosediphosphorsäure ist bereits nach der vierten Durchströmung vollständig (400 mg!), dabei nimmt aber der Reduktionswert ab, d. h. praktisch verschwindet Zucker. Der Abnahme des Reduktionswertes von 125 mg auf 73 mg (= 52 mg) entspricht aber durchaus nicht die Zunahme der Milchsäure, die selbst nach der sechsten Durchströmung immer erst den Wert von 21,6 mg-Proz. erreicht. Es ist daher die Annahme erlaubt, daß hier zwar eine Aufspaltung der Hexosediphosphorsäure quantitativ erfolgt ist, daß aber der daraus resultierende Zucker, d. h. die Fructose, nicht in Milchsäure zerlegt worden ist, sondern von der Leber zurückgehalten worden sein muß.

Die Versuche an den thyreopriven Hunden gestatten nun eine Erweiterung unserer oben gemachten Schlüsse. Abgesehen davon, daß die Lebern thyreopriver Hunde eine weit stärkerer Phosphatasewirkung entfalten als die pankreasdiabetischen Lebern, lassen sie den Nachweis der gespaltenen Fructose vermissen, geben aber auch keinen Hinweis darauf, daß die Fructose in Milchsäure gespalten wird, vielmehr wird die Deutung naheliegend, daß mit der Phosphatasewirkung eine Retention der Fructose in der Leber einhergeht; mit anderen Worten: die durch die Phosphatase frei gemachte Fructose wird in der Leber zurückgehalten, mit aller Wahrscheinlichkeit um hier zu

höheren Zuckerkomplexen kondensiert zu werden. In diesem Sinne ist auch ohne weiteres die Glykogenzunahme bei dem Durchströmungsversuch der pankreasdiabetischen Leber bei Insulinzusatz zu verstehen. Die Phosphatase in der Leber würde also nicht nur Lävulose und Phosphorsäure abspalten, sondern möglicherweise die frei werdende Bindungsenergie auf die Kondensierung der Zucker übertragen, so daß die Phosphatasewirkung auf diese Weise einer glykogensynthetisierenden Wirkung gleichkäme. In diesem Sinne ist aber die *Phosphatasewirkung bei pankreopriven Hunden als herabgesetzt anzusehen; bei thyreopriven Hunden als gesteigert.*

II. Teil.

Die Leberphosphatese der Hexosediphosphorsäure.

Euler und *Kullberg*[1]) war es gelungen, aus der unterhalb 50° getrockneten Stockholmer Unterhefe H einen Extrakt zu gewinnen, welcher die Fähigkeit besaß, die Synthese zwischen vorbehandelter Glucose oder Fructose und Phosphorsäure zu vermitteln, welches aber Hexosediphosphorsäure nicht spaltete. Nach *Euler*[2]) beweist diese Tatsache, daß die Bildung von Hexosediphosphorsäure keine einfache Umkehrung der Spaltung ist, sondern daß mit der enzymatischen Bindung der Phosphorsäure wenigstens noch *eine* andere Enzymwirkung, und zwar die Umwandlung der Hexosen verknüpft sein muß. Für diesen bei der Synthese der Hexosediphosphorsäure wirksamen Stoff hat *Euler*[3]) die Bezeichnung „Phosphatese" vorgeschlagen. Für die Hexosediphosphorsäure im tierischen Organismus muß ein Enzym angenommen werden, das die Glucose in Milchsäure umwandelt, während die eigentliche Phosphatese die Milchsäure mit der Phosphorsäure zu d-Fructosephosphorsäure synthetisiert. Diese Synthese wird ermöglicht auf Grund von Energie, die durch Oxydation eines Teiles der Milchsäure gewonnen wird. Schematisch wäre also der Vorgang so zu veranschaulichen:

$$\begin{array}{ll} & \text{Glucose} \\ \xrightarrow{\text{Glykolyse}} & \downarrow \\ \text{Phosphatese} & \left\{\begin{array}{l}\text{Milchsäure—}O_2\text{—}H_3PO_4 \\ \quad\downarrow \\ \text{Fructosediphosphorsäure}\end{array}\right. \\ \longrightarrow & \end{array}$$

Schon in unserer ersten Mitteilung[4]) war von uns gezeigt worden, daß das Insulin im intermediären Stoffwechsel der Leber (und der Muskulatur) einen oxybiotischen Vorgang bewirkt, indem Traubenzucker verschwindet, das Defizit aber nicht durch eine entsprechende Milchsäuremenge repräsentiert wird, wobei gleichzeitig anorganische

---

[1]) H. S. 74, 15, 1911.
[2]) *Euler*, Chemie der Enzyme, Teil II, S. 56. Bergmann, 1922.
[3]) H. S. 74, 13, 1911.
[4]) Diese Zeitschr. 147, Heft 1/2, 1924.

Phosphorsäure verschwindet. Daraus schlossen wir auf die Bildung von Hexosediphosphorsäure unter dem Einfluß des Insulins.

Wir haben nun diese Versuche weiter ausgeführt, indem wir dem speziellen Einfluß des Insulins auf die Phosphatese nachgingen.

Versuch 1 an einer normalen Kaninchenleber.

Eine 65 g schwere Leber eines gut genährten normalen entbluteten Kaninchens wird lebenswarm in Ringerlösung, die 0,1 Proz. Glucose enthält, im Verhältnis von 1 : 10 nach Verreibung im Mörser und Filtration durch Mull suspendiert und unter Luftdurchleitung 75 Minuten lang bei 38° gehalten. Alle 15 Minuten werden Proben entnommen, die auf N (Mikrokjeldahl), Milchsäure (*Clausen-Meyerhof*), Glucose (*Folin-Wu*), anorganische H_3PO_4 (*Embden*) und p_H (*Michaelis*) untersucht werden. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle angeführt.

Die Leber enthielt 4 Proz. Glykogen.

Tabelle A.

Die Werte sind in Prozenten der Ringerlösung (entsprechend 10 g des Organs) angegeben. Die einzelnen Portionen sind auf einen einheitlichen Stickstoffwert umgerechnet.

Zeit	Glucose mg-Proz.	Milchsäure mg-Proz.	Anorganische H_3PO_4 mg-Proz.	p_H	N-Gehalt mg-Proz.
Vor Beginn	202	3,4	1,3	7,0	319,2
Nach 15 Minuten . .	265	4,9	20	6,7	—
„ 30 „ . .	272	1,6	11	6,8	—
„ 45 „ . .	276	2,5	10	7,0	—
„ 60 „ . .	303	1,8	11	6,8	—

Tabelle B.

Derselbe Versuch, nur daß zu 250 ccm der Suspension 2 Einheiten englischen Insulins zugefügt wurden.

Zeit	Glucose mg-Proz.	Milchsäure mg-Proz.	Anorganische H_3PO_4 mg-Proz.	p_H	N-Gehalt mg-Proz.
Vor Beginn	227	7,7	1,3	6,9	257,6
Nach 15 Minuten . .	224	3,2	1,2	7,0	—
„ 30 „ . .	234	2,2	1,1	6,8	—
„ 45 „ . .	233	3,0	1,2	6,9	—
„ 60 „ . .	263	3,8	1,0	6,9	—

Vergleicht man die beiden Versuchsreihen A und B der gleichen normalen Leber untereinander, so läßt sich als der wesentliche Unterschied bei der insulinisierten Suspension die minimale Menge freier anorganischer H_3PO_4 hervorheben. Gegenüber der nicht insulinisierten Lebersuspension hat also das Insulin im Sinne einer Phosphatese gewirkt. Noch deutlicher sind die Verhältnisse im folgenden Versuch.

Versuch 2. Journal III, 19.

Ein Kaninchen von 2050 g Gewicht, gut genährt, das nicht gehungert hat, erhält um 9 Uhr vormittags 10 Einheiten Insulin (Burroughs & Welcome) intravenös und wird 9 Uhr 15 Minuten getötet.

Der Leberbrei (wie im ersten Versuch verarbeitet), mit Ringerlösung im Verhältnis von 1 : 10 suspendiert, wird in zwei Portionen zu je 250 ccm im Wasserbade bei 38° durchlüftet. Die Ringerlösung enthält 0,1 Proz. Glucose, aber *kein* H_3PO_4.

Versuch A.

Der Glykogengehalt der Leber beträgt in 10 g 0,35 g.

Zeit	Milchsäure mg-Proz.	Glukose mg-Proz.	Anorganisches H_3PO_4 mg-Proz.	p_H	N-Gehalt mg-Proz.
Vor Beginn	2,6	111	1,4	6,9	207,2
Nach 15 Minuten . .	3,4	109	1,1	6,8	—
„ 30 „ . .	1,8	—	1,1	6,8	—
„ 45 „ . .	3,2	104	0,6	7,0	—
„ 60 „ . .	2,0	104	0,6	6,9	—
„ 75 „ . .	1,3	114	0,4	6,9	—
„ 90 „ . .	5,0	128	0,4	7,0	—

Versuch B.

Mit Zusatz von 2 Einheiten Insulin auf 250 ccm der Suspension.

Zeit	Milchsäure mg-Proz.	Glukose mg-Proz.	Anorganisches H_3PO_4 mg-Proz.	p_H	N-Gehalt mg-Proz.
Vor Beginn	2,5	109	1,4	6,8	196
Nach 15 Minuten . .	5,0	106	1,4	7,0	—
„ 30 „ . .	3,7	102	0,9	6,9	—
„ 45 „ . .	4,5	126	1,0	7,0	—
„ 60 „ . .	2,8	137	0,7	6,8	—
„ 75 „ . .	4,0	129	0,7	6,6	—
„ 90 „ . .	4,9	123	1,0	6,6	—

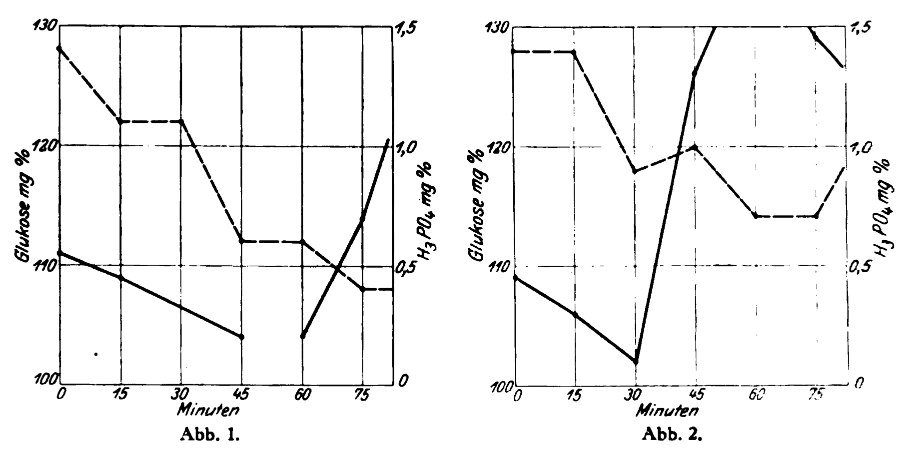


Abb. 1. Abb. 2.

Diese beiden Versuche, A ohne weiteren Zusatz von Insulin, B mit Zusatz von Insulin zur Suspension, demonstrieren aufs prächtigste die Einwirkung des Insulins. *Zunächst ist die zuckerausschüttende Wirkung der Leber für die Zeit von 60 Minuten in Versuch A, für die Zeit von 30 Minuten in Versuch B blockiert.* Statt dessen verschwindet Zucker, ohne daß ein Äquivalent von Milchsäure auftritt.

Versuch A.

Zeit	Glukose mg-Proz.	Milchsäure mg-Proz.	Bilanz der Kohlenhydrate mg-Proz.
Nach 15 Minuten	— 2	+ 0,8	— 1,2
„ 30 „	?	— 0,8	—
„ 45 „	— 7	+ 0,6	— 6,4
„ 60 „	— 7	— 0,6	— 7,4

Versuch B.

Zeit	Glukose mg-Proz.	Milchsäure mg-Proz.	Bilanz der Kohlenhydrate mg-Proz.
Nach 15 Minuten	— 3	+ 2	— 1,0
„ 30 „	— 7	+ 1,2	— 5,8

Dabei ist die Leber mit 3,5 Proz. sehr glykogenreich! Eine Zuckerausschüttung beginnt erst in Versuch A nach 75 Minuten, in Versuch B nach 45 Minuten, was kaum anders als auf eine diastasehemmende Wirkung des Insulins zurückzuführen ist. Die anorganischen Phosphorsäurewerte sind außerordentlich gering und werden noch geringer im Laufe des Versuchs, eine Tatsache, die wiederum sehr deutlich wird durch Vergleich mit dem Versuch I A.

Ein weiterer Versuch wurde an einem insulinisierten Hungerkaninchen angestellt.

Versuch 3. Journal III, 24.

Ein Kaninchen von 1900 g, das 24 Stunden gehungert hat, erhält 8 Uhr 45 Minuten 10 Einheiten Insulin (Burroughs & Welcome) und wird 9 Uhr 45 Minuten getötet. Die Leber enthält 22 Proz. Glykogen. Die Leber wird im Verhältnis von 1 : 10 in Ringerlösung mit 0,1 Proz. Glucose suspendiert (Technik wie in den beiden vorhergehenden Versuchen). Eine Portion von 235 ccm der Suspension wird ohne weiteren Insulinzusatz bei 38° C durchlüftet, die zweite nach Zusatz von 1 Einheit Insulin in vitro.

Versuch A.

Zeit	Glucose mg-Proz.	Milchsäure mg-Proz.	Anorganisches H_3PO_4 mg-Proz.	p_H	N-Gehalt mg-Proz.
Vor Beginn	154	3,6	1	7,0	268,8
Nach 15 Minuten	131	0,8	0,4	7,1	—
„ 30 „	135	4,5	0,6	6,8	—
„ 45 „	134	3,5	0,9	6,9	—
„ 60 „	?	1,6	0,6	6,8	—
„ 75 „	135	1,5	—	6,8	—

Versuch B.

Zusatz von 1 Einheit Insulin auf 235 ccm der Suspension.

Zeit	Glucose mg-Proz.	Milchsäure mg-Proz.	Anorganisches H_3PO_4 mg-Proz.	p_H	N-Gehalt mg-Proz.
Vor Beginn	160	4,3	0,5	6,8	260,4
Nach 15 Minuten	—	5,0	0,2	6,9	—
„ 30 „	—	5,0	0,4	6,9	—
„ 45 „	146	3,0	0,4	6,6	—
„ 60 „	136	2,5	1	6,6	—
„ 75 „	137	2,8	1,2	6,6	—

Auch in diesen beiden Parallelversuchen, die eine Leber betreffen, die 1 Stunde intravitem der Insulinisierung ausgesetzt worden war, ist das Zuckerdefizit ohne Milchsäureäquivalent zu finden, andererseits die außerordentlich geringen Werte freier Phosphorsäure.

Wir haben nunmehr die Versuche modifiziert, indem wir bei sonst gleicher Versuchsanordnung zu der Ringerlösung in je einem Versuch pro Liter 1 g Phosphorsäuregemisch ($^2/_3$ Na_2HPO_4, $^1/_3$ NaH_2PO_4) zugefügt haben, um deutlicher den Einfluß des Insulins auf die Phosphatese studieren zu können.

Versuch 4. Journal III, 27.

Normal genährtes Kaninchen im Gewicht von 2400 g erhält 10 Uhr 10 Minuten 10 Einheiten Insulin (Burroughs & Welcome) intravenös. Das Tier wird um 10 Uhr 40 Minuten getötet. Aufschwemmung der Leber als Emulsion im Verhältnis von 1 : 10 in Ringerlösung, die 0,1 Proz. Glucose enthält. Durchlüftung bei 38° C in je zwei Portionen von 250 ccm.

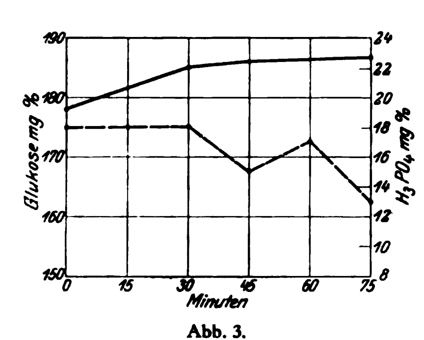


Abb. 3.

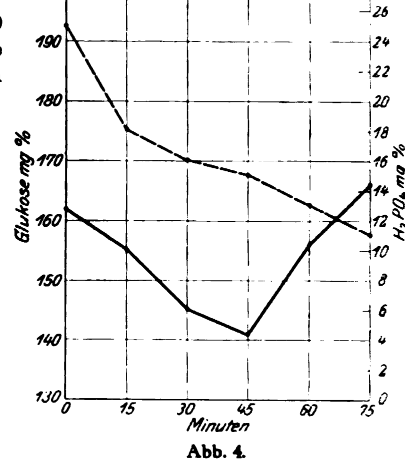


Abb. 4.

Versuch A.

Zeit	Glucose mg-Proz.	Milchsäure mg-Proz.	Anorganische H_3PO_4 mg-Proz.	p_H	N-Gehalt mg-Proz.
Vor Beginn	178	3,2	18	6,7	269
Nach 15 Minuten . .	—	4,0	18	6,6	—
„ 30 „ . .	185	4,4	18	6,7	—
„ 45 „ . .	186	2,0	15	6,6	—
„ 60 „ . .	—	2,5	17	6,6	—
„ 75 „ . .	187	7,0	13	6,4	—

Versuch B. Mit Zusatz von 1 g Phosphatgemisch ($^2/_3$ Di-, $^1/_3$ Mononatriumphosphat) zu 1 Liter Ringerlösung.

Zeit	Glucose mg-Proz.	Milchsäure mg-Proz.	Anorganische H_3PO_4 mg-Proz.	p_H	N-Gehalt mg-Proz.
Vor Beginn	162	5,8	25	6,6	291
Nach 15 Minuten . .	155	2,3	18	6,9	—
„ 30 „ . .	145	4,5	16	6,8	—
„ 45 „ . .	141	4,5	15	7,0	—
„ 60 „ . .	156	5,0	13	7,0	—
„ 75 „ . .	166	5,8	11	7,0	—

In diesen beiden Versuchen wird der Charakter der Insulinwirkung als Kinase einer Phosphatese deutlich. Die Wirkung wird gefördert durch Hinzufügung von Phosphatgemisch zur Ringerlösung; gleichzeitig zeigt sich mit der Phosphatesewirkung das Verschwinden von Kohlenhydrat:

Versuch B.

Zeit	Kohlenhydrat (Glucose bzw. Milchsäure) mg	H_3PO_4 mg
Nach 15 Minuten sind verschwunden	10,3	7
„ 30 „ „ „	18,3	9
„ 45 „ „ „	22,3	10
„ 60 „ „ „	6,8	12

Allerdings darf dabei nicht vergessen werden, daß auf das Verschwinden von Glucose hier nur aus den Veränderungen des Reduktionswertes geschlossen ist, die der Ausdeutung einigermaßen Schwierigkeit bereiten müssen, da ja erstens Glucose in Milchsäure gespalten, nach der Spaltung aber wieder zur Hexosediphosphorsäure synthetisiert wird, die andere Reduktionswerte ergibt. Dazu kommt noch die Bildung von Glucose aus dem Glykogen der Leber, wodurch die effektive Größe verschwundener Glucose gar nicht zu übersehen ist.

Schließlich führen wir noch einen letzten Versuch an, in dem an einem insulinisierten Tiere im Beginn des hypoglykämischen Komplexes in zwei Proben, ohne und mit Phosphatzusatz, die Insulinwirkung studiert wurde.

Versuch 5. Journal III, 30.

Ein normal genährtes Kaninchen, dem 5 Monate zuvor die Pankreasgänge unterbunden worden waren. Heilung reaktionslos, keine Störungen der Ernährung, kein Zucker. Das Tier erhält 10 Uhr 30 Minuten vormittags 20 Einheiten eines sehr wirksamen Insulins (Schering). Getötet wird das Kaninchen 1 Stunde später. Es stand bereits im Beginn eines hypoglykämischen Komplexes. Die Leber wird nach Verreibung mit Ringerlösung (1 : 10), die 0,1 Proz. Glucose enthält, suspendiert. Die Versuchsproben (250 ccm) in zwei Portionen A und B bei 38° C durchlüftet. Probe A ohne Zusatz von Phosphat, Probe B mit Zusatz von Phosphat.

Versuch A. Ringerlösung ohne Zusatz von Phosphat.

Zeit	Glucose mg-Proz.	Milchsäure mg-Proz.	Anorganische H_3PO_4 mg-Proz.	p_H	N-Gehalt mg-Proz.
Vor Beginn	108	2,5	32	7,0	220,0
Nach 15 Minuten . .	109	2,8	30	7,2	—
„ 30 „ . .	83	3,1	33	7,2	—
„ 45 „ . .	81	1,8	27	7,5	—
„ 60 „ . .	?	2,7	17	7,6	—
„ 75 „ . .	80	6,0	23	7,4	—

Versuch B.

Ringerlösung mit 1 Prom. Phosphatzusatz (2/3 Di-, 1/3 Mononatriumphosphat).

Zeit	Glucose mg-Proz.	Milchsäure mg-Proz.	Anorganische H_3PO_4 mg-Proz.	p_H	N-Gehalt mg-Proz.
Vor Beginn	211	3,3	27	7,1	269,0
Nach 15 Minuten . .	211	3,6	29	7,3	—
„ 30 „ . .	205	2,7	21	7,2	—
„ 45 „ . .	204	3,0	20	7,4	—
„ 60 „ . .	204	2,7	16	7,3	—
„ 75 „ . .	182	4,5	22	7,4	—

Auch dieser Versuch zeigt die Einwirkung des Insulins auf die Phosphatese: Zunehmende Verringerung der anorganischen Phosphorsäure, Abnahme der Zuckerwerte ohne entsprechenden Zuwachs an Milchsäure.

Wir gehen also nicht fehl, wenn wir behaupten, daß das wirksame Prinzip des Insulins eine Kinase sei, die auch außerhalb des Tierkörpers imstande ist, die Phosphatese zu aktivieren. Die Kinase ist relativ hitzebeständig (bis etwa 93°) und wirkt in vivo wie in vitro. Die Phosphatesekurven tragen dabei den Charakter der Exponentialkurven, wie die nebenstehende Kurve zeigt[1]*).*

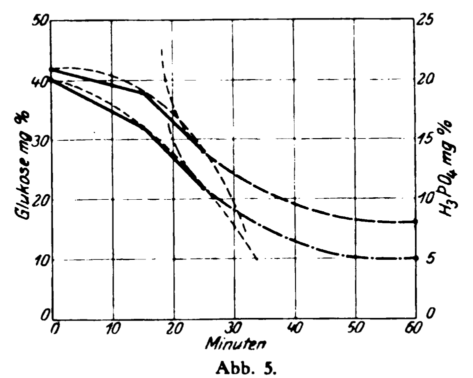


Abb. 5.

Es fragt sich natürlich, ob die Kinasewirkung der Phosphatese allein genügt, um die Insulinwirkung zu erklären. Wir glauben aber diese Vermutung aussprechen zu dürfen. Da der Zuckeraufbau mit der Milchsäurespaltung beginnt (sogenanntes glykolytisches Ferment), über die Phosphatesewirkung zur Fructosediphosphorsäure führt und über die Phosphatasewirkung zur Abspaltung von Lävulose hin zum Aufbau der Di- und Polysaccharide, so erhellt, daß allein schon der Ausfall der Kinasewirkung des Insulins die mangelnde Zuckerverwertung im Sinne des Aufbaus zum Glykogen erklärt.

[1]) Siehe *Brugsch, Benatt, Horsters* und *Katz,* diese Zeitschr. **147,** 117, 1924.

Untersuchungen zur Lehre von der Blutgerinnung. XII.

Von

Bernhard Stuber.

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik zu Freiburg i. Br.)

Über den Nachweis des sogenannten Thrombins im strömenden Blute.

Von

Paul Kuhn.

(Eingegangen am 15. Januar 1925.)

Nach den Anschauungen der Fermentlehre findet sich im strömenden Blute kein Thrombin, es ist vielmehr nur in einer unwirksamen Vorstufe darin enthalten. Durch die früheren Untersuchungen aus dem hiesigen Laboratorium hatte die Wirkungsweise des Thrombins eine rein physikalisch-chemische Erklärung gefunden, außerdem wurden mehrere experimentelle Tatsachen aufgedeckt, welche die physiologische Bedeutung des Thrombins überhaupt in Frage stellten. Eine andere Erklärung, als daß es sich bei dem Thrombin der Fermentlehre um ein Kunstprodukt handle, schien uns auf Grund unserer früheren Befunde nicht möglich. Von diesen Gesichtspunkten aus war das Fehlen des Thrombins im strömenden Blute nicht verständlich. Eine Nachprüfung dieser Vorstellung der Fermentlehre erschien deshalb zwingend. Dieselbe fußt auf Untersuchungen von *Alexander Schmidt*. In seiner Monographie „Zur Blutlehre“ führt er neben anderen Eigenschaften des Thrombins folgenden Befund an: „Es ist ebenso eine Tatsache, daß das Alkoholkoagulum des zirkulierenden Blutes (welches man zu diesem Zwecke aus der Ader direkt in den Alkohol fließen läßt) bei derselben Behandlung einen fast völlig unwirksamen Wasserextrakt liefert, daß demnach der wirksame Stoff erst außerhalb des Organismus entsteht bzw. gewaltig zunimmt.“ Das Thrombin fehlt also nach *Alexander Schmidt* im strömenden Blute nicht völlig, es handelt sich vielmehr um einen Mangel an Thrombin, der, wie er sich ausdrückt, „kein ganz absoluter, sondern ein relativer, in letzterem Sinne aber freilich ein

sehr großer" ist. Die Untersuchungen von *Alexander Schmidts* Schüler *Birk*[1]) ergaben in sämtlichen Versuchen ein Vorkommen von Thrombin im strömenden Blute, wenn auch in weit geringerer Menge als im „abgestorbenen" Blute. Es ist deshalb auffallend, daß in der späteren Literatur gerade unter Berufung auf diese Untersuchungen der *Schmidt*schen Schule von einem Fehlen des Ferments im strömenden Blute gesprochen wird.

Schon theoretisch waren nun gegen Folgerungen, die *Alexander Schmidt* aus seinen Versuchen zog, Einwände möglich. Zunächst haben wir bei der Fällung des Gesamtblutes mit Alkohol ein ganz anderes Kolloidgemisch vor uns, als bei der Fällung des Serums, der üblichen Methode der Thrombindarstellung. Die Fällung erfolgt im ersten Falle in einem ganz anderen kolloidchemischen Milieu, wodurch die Bedingungen der Alkoholpräzipitierung wesentlich andere sein können als im letzteren Falle. Kolloidchemisch ist fraglos das Präzipitat des Gesamtblutes etwas ganz anderes als das Präzipitat des Serums. Außerdem war denkbar, daß bei der Alkoholfällung des Gesamtblutes durch die intensive Schädigung der korpuskulären Elemente vielleicht gerinnungshemmende Substanzen dem Präzipitat beigemengt werden, die das Ausbleiben der Gerinnung bedingten. Ob diese Einwände zu Recht bestehen, soll im folgenden entschieden werden.

Wir benutzten für unsere Untersuchungen Blut vom Menschen, Hunde und Kaninchen. Das Menschenblut wurde aus der Cubitalvene, das Tierblut aus der Carotis entnommen. Wir benutzten eine kleine, gut paraffinierte Gefäßkanüle, die am Ende ein 10 cm langes, ebenfalls gut paraffiniertes Schlauchstück trug, letzteres tauchte bei der Entnahme in den Alkohol hinein, so daß das Blut direkt unter Alkohol aufgefangen wurde. Da die Einbindung der Kanüle eine kurze Stauung des Blutes bedingt, ließen wir die ersten Kubikzentimeter abfließen. Wir ließen das Blut immer in die 20fache Menge von Alkohol einfließen. Nach Umschütteln wurde das Blutkoagulum sofort oder nach verschieden langem Stehen (s. die Protokolle) abfiltriert, das Präzipitat auf dem Filter ausgebreitet und durch Lufttrocknung bei Zimmertemperatur von Alkohol befreit. Das Trockenpulver wurde dann mit kalkfreier 0,9proz. NaCl-Lösung zerrieben und 4 bis 6 Stunden extrahiert. Wir benutzten zur Extraktion, wie früher, immer 5 g Pulver auf 100 ccm NaCl-Lösung. Nach beendeter Extraktion wurde vom Ungelösten abfiltriert. Unter Thrombin ist deshalb auch in dieser Arbeit immer eine derartige 5proz. Lösung zu verstehen. Als Fibrinogen diente uns Pferdefibrinogen nach *Hammarsten*. Es wurde immer vor Einstellung in die eigentlichen Versuche auf Kalk- und Verdünnungsstabilität geprüft. Das Plasma stammte vom Kaninchen und enthielt 1,5 Prom. Kaliumoxalat. Die Beobachtungsdauer betrug 24 Stunden. Unter Gerinnung ist vollständige Gerinnung zu verstehen, so daß die gesamte Flüssigkeit fest erstarrt war.

---

[1]) Inaug.-Dissert. Dorpat 1880.

In Tabelle I bis IV geben wir unsere Versuche mit Kaninchenblut wieder.

Tabelle I. Versuche mit Thrombin aus Kaninchenblut.

		Gerinnung
1 ccm Fibrinogen	+ 1 ccm Thrombin I	nach 6 Stunden +
1 " "	+ 1 " " I	" " +
1 " "	+ 1 " " I	" " +
1 " "	+ 1 " " I	" " +
1 " "	+ 2 " " I	" 2 " +
1 " "	+ 2 " " I	" 3 " +
1 " "	+ 2 " " I	" 3 " +
1 " "	+ 2 " " I	" 2 " +
1 " "	+ 2 " " I	" 2 " +
1 " "	+ 2 " " I	" 2 " +
1 " "	+ 1 " Serum	" 8 " +

Das Blutpräzipitat wurde eine halbe Stunde nach Entnahme vom Alkohol abfiltriert. Das Fibrinogen hatte 10 Prom. Eiweiß und 2,6 Proz. NaCl-Gehalt. Die Thrombinlösung enthielt 4 Prom. Eiweiß.

Tabelle II. Versuche mit Thrombin aus Kaninchenblut.

		Gerinnung
1 ccm Fibrinogen	+ 1 ccm Thrombin I	—
1 " "	+ 2 " " I	—
1 " "	+ 1 " " II	nach 12 Stunden +
1 " "	+ 1 " " II	" 8 " +
1 " "	+ 2 " " II	" 6 " +
1 " "	+ 1 " Serum	" 12 " +
1 " "	+ 1 " "	" 12 " +

Fibrinogen dasselbe wie in Tabelle I. Die Thrombinlösung hatte 6 Prom. Albumen. Das Blutpräzipitat wurde erst nach 2 Tagen vom Alkohol abfiltriert.

Tabelle III. Versuche mit Thrombin aus Kaninchenblut.

		Gerinnung
1 ccm Fibrinogen	+ 1 ccm Thrombin I	nach 4 Stunden +
1 " "	+ 2 " " I	" 3 " +
1 " "	+ 1 " " II	" 6 " +
1 " "	+ 2 " " II	" 4 " +
1 " "	+ 1 " " III	" 12 " +
1 " "	+ 2 " " III	" 12 " +
1 " "	+ 1 " " III a	" 12 " +
1 " "	+ 2 " " III a	" 12 " +
1 " "	+ 1 " " IV	—
1 " "	+ 2 " " IV	—
1 " "	+ 1 " Serum	nach 10 Stunden +

Das Fibrinogen hatte 6 Prom. Albumen und 3,8 Proz. NaCl. Thrombin I enthielt 8 Prom. Albumen, ebenso Thrombin II, Thrombin III und Thrombin IIIa hatten 3 Prom. Albumen, Thrombin IV enthielt nur Spuren Eiweiß, die mit *Esbach* nicht zu bestimmen waren. Das Blutpräzipitat wurde 4 Stunden nach der Blutentnahme vom Alkohol abfiltriert.

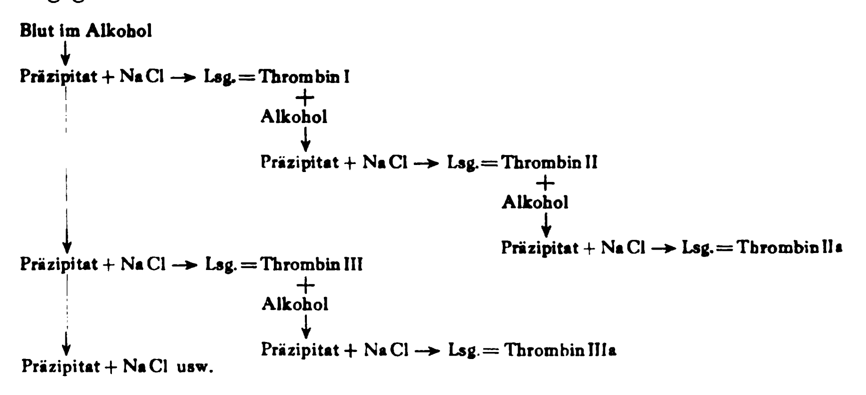
Tabelle IV.

Versuche mit Thrombin aus Kaninchenblut.

	Gerinnung
1 ccm 1,5 prom. Oxalatplasma + 1 ccm Thrombin I	nach 14 Stunden +
1 „ 1,5 „ „ + 2 „ „ I	„ 12 „ +
1 „ 1,5 „ „ + 1 „ „ II	„ 12 „ +
1 „ 1,5 „ „ + 2 „ „ II	„ 4 „ +
1 „ 1,5 „ „ + 1 „ „ III	„ 2 „ +
1 „ 1,5 „ „ + 2 „ „ III	„ 2 „ +
1 „ 1,5 „ „ + 2 Tropfen 5 proz. $CaCl_2$	„ ½ Stunde +
1 „ 1,5 „ „ + 2 „ 5 „ $CaCl_2$	„ 20 Minuten +

Fibrinogen und Thrombin dieselben wie Tabelle III. Das Plasma stammte vom Kaninchen.

Es fiel uns sofort auf, daß es nicht gleichgültig ist, wie lange der Alkohol auf das Blutkoagulum einwirkt. Während in Tabelle I nach ½stündigem Stehen des Blutkoagulums in Alkohol das daraus dargestellte Thrombin voll wirksam ist, ersehen wir aus Tabelle II, daß bei zweitägigem Verweilen des Blutkoagulums in Alkohol das entsprechende Thrombin versagt. Wir gingen deshalb weiterhin so vor, daß wir auf Grund der eingangs dargelegten theoretischen Überlegungen durch weiteres Umfällen des zuerst erhaltenen Thrombins wieder mit der 20fachen Menge Alkohol geeignetere Präparate zu erhalten suchten. Dabei wurde sowohl die Thrombinlösung als auch der nach der Extraktion jedesmal verbleibende Rückstand in der in folgender Übersicht angegebenen Weise weiter verarbeitet.



Wie aus Tabelle II zu entnehmen ist, ließ sich durch diese Umfällung der vorher unwirksame Extrakt in einen stark wirksamen überführen. Seine Wirkung war zeitlich mit der des Serums gleichwertig. Eine Erschöpfung des Blutkoagulums an gerinnungsauslösender Substanz trat erst bei der dritten Extraktion auf (Tabelle III), wohl

bedingt durch die Eiweißarmut der Extraktionsflüssigkeit. Auch bei Verwendung von Oxalatplasma als Gerinnungssubstrat trat völlige Gerinnung ein. Auch beim Hundeblut zeigten sich ähnliche Verhältnisse.

Tabelle V.

Versuche mit Hundeblut (Hund A).

		Gerinnung
1 ccm Fibrinogen	+ 1 ccm Thrombin I	nach 2 Stunden +
1 „ „	+ 1 „ „ I	„ 2 „ +
1 „ „	+ 2 „ „ I	„ 2 „ +
1 „ „	+ 1 „ „ II	„ 10 Minuten +
1 „ „	+ 1 „ „ II	„ 10 „ +
1 „ „	+ 2 „ „ II	„ 10 „ +

Das Fibrinogen hatte 6 Prom. Albumen und 3,5 Proz. NaCl. Thrombin I enthielt 3 Prom. Albumen, Thrombin II 4 Prom. Albumen. Das Blutpräzipitat wurde sofort nach der Blutentnahme vom Alkohol abfiltriert.

Tabelle VI.

Versuche mit Hundeblut (Hund B).

		Gerinnung
1 ccm Fibrinogen	+ 1 ccm Thrombin I	nach 10 Minuten +
1 „ „	+ 1 „ „ I	„ 10 „ +
1 „ „	+ 2 „ „ I	„ 10 „ +
1 „ „	+ 1 „ „ II	„ 6 „ +
1 „ „	+ 1 „ „ II	„ 6 „ +
1 „ „	+ 2 „ „ II	„ 6 „ +

Fibrinogen dasselbe wie in Tabelle V. Das Blutpräzipitat wurde 5 Minuten nach der Blutentnahme vom Alkohol abfiltriert.

Tabelle VII.

Versuche mit Hundeblut (Hund B).

		Gerinnung
1 ccm Fibrinogen	+ 1 ccm Thrombin I	nach 5 Minuten +
1 „ „	+ 1 „ „ I	„ 5 „ +
1 „ „	+ 2 „ „ I	„ 5 „ +
1 „ „	+ 1 „ „ II	„ 2 „ +
1 „ „	+ 1 „ „ II	„ 2 „ +
1 „ „	+ 2 „ „ II	„ 2 „ +

Fibrinogen dasselbe wie in Tabelle V. Thrombin I und II hatten 8 Prom. Albumen. Das Blutpräzipitat wurde sofort nach der Blutentnahme vom Alkohol abfiltriert.

Tabelle VIII. Versuche mit Hundeblut (Hund B).

		Gerinnung
1 ccm Fibrinogen	+ 1 ccm Thrombin I	nach 8 Minuten +
1 „ „	+ 1 „ „ I	„ 8 „ –
1 „ „	+ 2 „ „ I	„ 8 „ –
1 „ „	+ 1 „ „ II	„ 2 „ +
1 „ „	+ 1 „ „ II	„ 2 „ +
1 „ „	+ 2 „ „ II	„ 2 „ +

Fibrinogen dasselbe wie in Tabelle V. Thrombin I und II 12 Prom. Albumen. Das Blutpräzipitat wurde $^3/_4$ Stunden nach Blutentnahme vom Alkohol abfiltriert.

Tabelle IX. Versuche mit Hundeblut (Hund A).

		Gerinnung
1 ccm Fibrinogen	+ 1 ccm Thrombin I	—
1 „ „	+ 1 „ „ I	—
1 „ „	+ 2 „ „ I	—
1 „ „	+ 1 „ „ II	—
1 „ „	+ 1 „ „ II	—
1 „ „	+ 2 „ „ II	—

Fibrinogen dasselbe wie in Tabelle V. Thrombin I 6 Prom. Albumen. Thrombin II 8 Prom. Albumen. Das Blutpräzipitat wurde $1\frac{1}{2}$ Stunden nach der Blutentnahme vom Alkohol abfiltriert.

Tabelle X. Versuche mit Hundeblut (Hund B).

		Gerinnung
1 ccm Fibrinogen	+ 1 ccm Thrombin I	—
1 „ „	+ 1 „ „ I	—
1 „ „	+ 2 „ „ I	—
1 „ „	+ 1 „ „ II	—
1 „ „	+ 1 „ „ II	—
1 „ „	+ 2 „ „ II	—

Fibrinogen dasselbe wie in Tabelle V. Thrombin I und II 8 Prom. Albumen. Das Blutpräzipitat wurde 24 Stunden nach Blutentnahme vom Alkohol abfiltriert.

Kurze Einwirkung des Alkohols liefert stark wirksame Extrakte (Tabelle V bis VIII), längere Einwirkung hebt die Wirkung auf (Tabelle IX bis X). Dabei scheint die Alkoholempfindlichkeit des Hundeblutes weit größer als die des Blutes vom Kaninchen. Ebenso findet sich auch hier eine Steigerung der gerinnungsauslösenden Fähigkeit durch weitere Alkoholumfällung. Bei den von Anfang an unwirksamen Extrakten (Tabelle IX und X) war jedoch hier, im Gegensatz zum Kaninchenblut, durch weiteres Umfällen kein positives Resultat mehr zu erreichen. Es wäre möglich, daß weitere zeitliche Variierung des Alkoholeinflusses noch ein Ergebnis liefern könnte. Der Eiweißgehalt

der Thrombinlösungen kann in weiten Grenzen schwanken, er darf nur nicht zu gering sein (Tabelle III).

Tabelle XI. Versuche mit Menschenblut.

		Gerinnung
1 ccm Fibrinogen	+ 1 ccm Thrombin I	—
1 " "	+ 1 " " I	—
1 " "	+ 2 " " I	—
1 " "	+ 1 " " II	nach 2 Stunden +
1 " "	+ 1 " " II	" 2 " +
1 " "	+ 2 " " II	" 2 " +

Das Fibrinogen hatte 5 Prom. Albumen und 4,5 Proz. NaCl. Thrombin I und II 9 Prom. Albumen. Das Blutpräzipitat wurde 10 Minuten nach Blutentnahme abfiltriert.

Tabelle XII. Versuche mit Menschenblut.

		Gerinnung
1 ccm Fibrinogen	+ 1 ccm Thrombin I	—
1 " "	+ 1 " " I	—
1 " "	+ 2 " " I	—
1 " "	+ 1 " " II	nach 24 Stunden +
1 " "	+ 1 " " II	" 24 " +
1 " "	+ 2 " " II	" 24 " +

Fibrinogen dasselbe wie in Tabelle XI. Thrombin I 6 Prom. Albumen, Thrombin II 5 Prom. Albumen. Das Blutpräzipitat wurde 1½ Stunden nach Blutentnahme vom Alkohol abfiltriert.

Tabelle XIII. Versuche mit Menschenblut.

		Gerinnung
1 ccm Fibrinogen	+ 1 ccm Thrombin I	—
1 " "	+ 1 " " I	—
1 " "	+ 2 " " I	—
1 " "	+ 1 " " II	nach 24 Stunden +
1 " "	+ 1 " " II	" 24 " +
1 " "	+ 2 " " II	" 24 " +
1 " "	+ 1 " " II a	" 16 " +
1 " "	+ 1 " " II a	" 16 " +
1 " "	+ 1 " " II a	" 16 " +

Fibrinogen dasselbe wie in Tabelle XI. Das Blutpräzipitat wurde sofort nach der Blutentnahme vom Alkohol abfiltriert.

In den Tabellen XI bis XIII finden sich unsere Versuche mit Menschenblut. Hier gelang es uns trotz verschiedener zeitlicher Variierung der Alkoholeinwirkung niemals, mit der ersten Extraktion die Gerinnung auszulösen. Wohl aber erreicht man auch hier durch Umfällen mit Alkohol stark wirksame Extrakte. Wir betonen noch, daß in allen Versuchen, auch beim Hunde- und Kaninchenblut,

sich das zum zweiten Male umgefällte wirksame Thrombin gegen Alkohol resistenter zeigte als die erste Fällung. Es ergab sich also in allen Versuchen eine *bestimmte Abhängigkeit der gerinnungsauslösenden Fähigkeit der Extrakte von der Dauer der Alkoholeinwirkung* auf das Blutkoagulum, und zwar auch diesbezüglich wieder Verschiedenheiten zwischen den einzelnen Tierarten, und hier wieder zwischen den einzelnen Tieren derselben Rasse. Am günstigsten liegen die Verhältnisse beim Kaninchenblut. Wir bemerken besonders, daß die in unseren Protokollen angegebene Verweildauer des Blutkoagulums in Alkohol sich auf den Zeitpunkt des Abfiltrierens bezieht. Da die Alkoholpräzipitate bei Zimmertemperatur getrocknet wurden, so war die gesamte Einwirkung des Alkohols eine wesentlich längere. Die genaue optimale Dauer der Einwirkung kann nicht im voraus für den einzelnen Fall angegeben werden. Sie muß im Versuch erst festgestellt werden. *In allen Versuchen konnte gezeigt werden, daß es unter geeigneten Bedingungen gelingt, im strömenden Blute reichliche Mengen von Thrombin nachzuweisen, Mengen, die in der Wirkung denen im Serum nicht nachstehen.* Worauf die differente Wirkung der Extrakte. je nach der Dauer der Alkoholeinwirkung beruht, vermögen wir nicht sicher zu beantworten. Wir glauben aber die Ursache auf die durch die zeitliche Variierung des Alkoholeinflusses bedingte verschiedene Zustandsänderung der Bluteiweißkörper zurückführen zu müssen, die in der nachfolgenden Lösung derselben auch ganz verschiedene Dispersitätsgrade bedingen muß. Derartige Unterschiede in der Alkoholwirkung auf einzelne Eiweißkörper sind ja bekannt. Ob durch die Umfällung eine Entfernung gerinnungshemmender Substanzen, wie schon oben angedeutet, dabei noch eine Rolle spielt, vermögen wir nicht zu entscheiden. Es ist uns jedoch nicht gelungen, unwirksame Extrakte durch Dialyse wirksam zu machen. Es fiel uns auch bei der Verarbeitung der Blutpräzipitate die verschiedene Löslichkeit derselben je nach der Dauer der Alkoholeinwirkung auf. Zudem beobachteten wir hier auch wieder individuelle Unterschiede.

Das Wesentliche unserer Untersuchungsergebnisse sehen wir in dem Nachweis von reichlichen Mengen Thrombins im strömenden Blute. Wir erblicken darin eine weitere Schwierigkeit für die Fermentlehre des Gerinnungsprozesses. Wozu noch ein Proferment, wenn genügend fertiges Ferment im strömenden Blute vorhanden ist? *Andererseits betrachten wir unsere Versuche als eine weitere Stütze unserer kolloidchemischen Theorie des Gerinnungsvorganges, im speziellen unserer Anschauung vom Wesen des sogenannten Thrombins.*

Isolierung der Perhydridase (Schardingerenzym) der Milch.

Von

B. Sbarsky und **D. Michlin.**

(Aus dem biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.)

(Eingegangen am 17. Januar 1925.)

Von *Schardinger* (1) ist die Beobachtung gemacht worden, daß ein Gemisch von Methylenblau und Formaldehyd durch frische, ungekochte Milch bei 70° in wenigen Minuten entfärbt wird. Weitere Versuche zeigten, daß diese Reduktion durch ein besonderes Enzym, das „Schardingerenzym", ausgelöst wird, wobei der Formaldehyd durch andere Aldehyde ersetzt werden kann. Später konnte *Bach* (2) nachweisen, daß das Schardingerenzym nicht nur Farbstoffe zu Leucobasen, sondern auch Nitrate zu Nitriten reduziert. Diese Reaktion faßt *Bach* als einen, auf Kosten der Elemente des Wassers verlaufenden, oxydoreduzierenden Prozeß auf, wobei Aldehyde als Sauerstoffakzeptoren, Farbstoffe und Nitrate als Wasserstoffakzeptoren fungieren. Das Schardingerenzym gestaltet sich also als eine Oxydoredukase. Bei der Erforschung der Beziehungen des Schardingerenzyms zu der Redukase der Gewebe stellte *Bach* fest, daß Aldehyde in dieser Reaktion durch Eiweißabbauprodukte ersetzt werden können. Letztere enthalten also Substanzen, die leicht oxydabel sind und deshalb als Sauerstoffakzeptoren dienen. Vor kurzem zeigten *Morgan*, *Stewart* und *Hopkins* (3), daß Methylenblau durch das Milchferment auch in Anwesenheit von Xanthin oder Hypoxanthin entfärbt wird. Dabei werden diese Purinbasen zu Harnsäure auf Kosten des Wassers oxydiert.

Betreffend die Natur und die Nomenklatur des Ferments der Milch herrscht zurzeit beträchtliche Verwirrung. *Bach* stellt die Reduktionsseite der Reaktion in den Vordergrund und hält das Schardingerenzym für ein reduzierendes Ferment. Seiner Ansicht nach beschleunigt es gekoppelte Oxydoreduktionsreaktionen durch Wegschaffen des Wasserstoffs des Wassers. Es überträgt labilen Wasserstoff (Perhydridwasserstoff) auf reduzierbare Körper in ähnlicher Weise, wie Peroxydase labilen Sauerstoff (Peroxydsauerstoff) auf oxydierbare

Körper überträgt. In Anbetracht dieser Analogie schlug *Bach* vor, das Schardingerenzym mit dem Namen *Perhydridase* zu belegen.

Morgan, Stewart und *Hopkins* fassen die oxydative Seite der Reaktion ins Auge, bezeichnen das Ferment der Milch, durch welches Xanthin und Hypoxanthin zu Harnsäure oxydiert wird, als *Xanthinoxydase* und betrachten es als nicht identisch mit dem Schardingerenzym, welches Aldehyde zu den entsprechenden Säuren oxydiert. Sie meinen, es sei wenig wahrscheinlich, daß die Oxydation der Aldehyde und des Xanthins bzw. Hypoxanthins durch dasselbe Ferment zustande komme. Zwingend ist aber dieses Argument nicht.

Dixon und *Thurlow* (4) sprechen sich für die Einheitlichkeit des Schardingerenzyms aus und bezeichnen es ohne weiteres als Xanthinoxydase. Wie es aus nachstehendem ersichtlich wird, ist es uns gelungen, aus frischer Milch ein Fermentpräparat zu isolieren, welches *gleichzeitig Farbstoffe und Nitrate reduziert und Aldehyde, Hypoxanthin und Xanthin oxydiert.*

Darstellung von haltbaren Perhydridasepräparaten.

Die Bemühungen mehrerer Forscher, die Oxydoredukase aus der Milch zu isolieren, blieben bisher erfolglos.

Bereits im Jahre 1906 versuchte *Seligmann* (5), das Ferment durch Ausschütteln des Milchrahms mit Wasser zu isolieren. *Smidt* (6) wiederholte dieselben Versuche mit NaCl-Lösung. *Aloy* und *Valdiquie* (7) suchten das Casein durch Sättigung mit NaCl zu entfernen und das Ferment aus dem Filtrat durch Ammoniumsulfat auszufällen. *Haas* und *Hill* (8) versetzten die Milch direkt mit Ammoniumsulfat oder mit gesättigter Bleiacetatlösung. Vor kurzem wurde das gleiche Verfahren von *Dixon* und *Thurlow* benutzt. Es gelang ihnen, das Casein nebst einem Teil des Ferments auszusalzen. Der Fermentgehalt des Niederschlags war aber so gering, daß sie zur Ausführung der Reaktion nicht weniger als 1,5 g des Trockenpulvers anwenden mußten.

Für die Wahl des zur Darstellung der Perhydridase geeigneten Ausgangsmaterials ist die Kenntnis der Verteilung des Enzyms in den verschiedenen Milchprodukten erforderlich. Dafür ist aber die zur Bestimmung der Enzymwirkung angewandte Methode maßgebend.

Es wird gewöhnlich zur qualitativen Bestimmung der Perhydridase die Methylenblaumethode, die noch von *Schardinger* herrührt, benutzt. Im wesentlichen besteht dieselbe darin, daß man der frischen ungekochten Milch eine Lösung von Methylenblau und Formaldehyd (Schardingerreagens) zusetzt und im Wasserbad bei 60° stehen läßt. Eine mehr oder weniger rasche Entfärbung des Gemisches weist auf die Anwesenheit des Ferments hin. Dieselbe Methode wurde auch zu *quantitativer* Bestimmung des Fermentgehalts angewandt, wobei als Merkmal die zur gänzlichen Entfärbung des Methylenblaues erforderliche Zeit diente. Diese Methode

wurde auch in den unlängst erschienenen Arbeiten von *Morgan, Stewart* und *Hopkins* und auch *Dixon* und *Thurlow* angewandt. Sie kann aber keinesfalls für einwandfrei gelten. Bei geringem Gehalt der Milch an Enzym ist man genötigt, ganz minimale Konzentrationen der Methylenblaulösung anzuwenden, um eine volle Entfärbung zu erreichen. So wandten z. B. *Morgan, Stewart* und *Hopkins* in ihren Arbeiten über die Oxydation des Xanthins eine Methylenblaulösung an, die 0,00001 ccm Methylenblau in 1 ccm der Gesamtflüssigkeit enthält. Bei größerem Enzymgehalt werden derartige schwache Lösungen fast momentan entfärbt, und dann sind die Reaktionszeiten nicht genau meßbar. Andererseits sind größere Konzentrationen der Methylenblaulösung nicht brauchbar, denn eine schwache Fermentlösung wird nicht imstande sein, sie gänzlich zu entfärben. Eine bloße Verminderung der Farbintensität ist kolorimetrisch nicht bestimmbar, da die Methylenblaulösung durch den Milchzusatz ihre Färbung ändert. Bei der Methylenblaumethode scheint uns auch besonders störend der Umstand, daß die Leucobase des Methylenblaues schnell an der Luft oxydiert wird und die Lösung, von der Oberfläche dem Boden hinzu, wieder gefärbt wird. Diese Wiederfärbung geht der Entfärbung parallel und verhindert, den Moment der völligen Entfärbung festzustellen. Um diesem Übelstand vorzubeugen, waren *Dixon* und *Thurlow* genötigt, ihre Versuche in geschlossenen, bis zu 5 mm Druck evakuierten und dann dreimal mit Stickstoff ausgespülten Röhrchen auszuführen.

Aus obigen Gründen ist die Methylenblaumethode kaum als eine quantitative zu bezeichnen. Viel besser ist die Methode der Nitratreduktion, die zuerst von *Bach* in seinen Arbeiten über die Perhydridase der Milch angewandt worden ist.

Bach zeigte, daß die Milchperhydridase, die für sich allein auf Nitrate ohne Wirkung ist, letztere ziemlich rasch in Gegenwart von Aldehyden reduziert. Zur *quantitativen* Untersuchung der Reduktion der Nitrate durch das System „Perhydridase-Aldehyd" wurde von ihm folgende Methode ausgearbeitet. Zu einer bestimmten Menge Kuhmilch wird Acetaldehydlösung und Natriumnitrat (nitritfrei) zugefügt und in verschlossenen Gefäßen im Thermostaten bei 60° stehengelassen. Bei dem Reduktionsprozeß wird Natriumnitrit erhalten, dessen Mengen proportional dem Fermentgehalt sind. Nach Verlauf einer halben Stunde werden einige Kubikzentimeter einer gesättigten Lösung von basischem Bleiacetat zugesetzt (Eiweißfällen), das Gemisch wird durch ein trockenes Filter filtriert. In dieser Weise wird ein wasserklares, völlig farbloses Filtrat erhalten, in dem der Nitritgehalt ebenso genau wie im Wasser nach der *Ilosvay-Lunge*schen Methode mit α-Naphthylamin und Sulfanilsäure in verdünnter Essigsäurelösung bestimmt werden kann. Die Resultate werden in Milligramm N_2O_3 pro 1 ccm des Ausgangsmaterials berechnet.

Mit dieser Methode haben wir Milch und Milchprodukte, Vollmilch, Magermilch, Rahm und Butter, auf ihren Gehalt an Perhydridase quantitativ untersucht. Frische Kuhmilch wurde im Separator in ihre Bestandteile geteilt. Proben, je 2 ccm Vollmilch, Magermilch,

Rahm oder 2 g Butter, wurden zur Bestimmung des Ferments entnommen. Von diesen Bestandteilen wurde je eine Probe zur Kontrolle bis zum Sieden erhitzt. Sämtlichen Proben wurde dann 1 ccm Acetaldehydlösung (1 proz.) und 1 ccm 20proz. Natriumnitratlösung (nitritfrei) zugesetzt, gut durchgemischt und im Thermostaten bei 60° stehengelassen. Nach Ablauf einer halben Stunde wurden die Proben mit je 3 ccm einer klaren, gesättigten Lösung von basischem Bleiacetat (Eiweißfällung) versetzt, durch ein trockenes Filter filtriert und im klaren Filtrat wurde die Nitritmenge kolorimetrisch nach *Ilosvay-Lunge* bestimmt.

In nachstehender Tabelle sind die Reduktionsvermögen der erwähnten Milchprodukte in Milligramm N_2O_3 pro Kubikzentimeter (bzw. Gramm) des Ausgangsmaterials angegeben.

	N_2O_3 in mg
Vollmilch	0,0027
Magermilch	0,0007
Rahm	0,0068
Butter	0,0006

Aus obigen Zahlen geht hervor, daß bei dem Aufarbeiten der Milch in ihre Bestandteile das Ferment, fast quantitativ, mit dem Fett in den Rahm übergeht. Letzterer enthält 2,5mal so viel Enzym wie die ursprüngliche Milch und 10mal soviel wie die Magermilch. Diese Resultate stimmen völlig mit denen von *Seligmann* überein, welcher schon im Jahre 1909 darauf hingewiesen hat, daß der Rahm schneller Methylenblau entfärbe, als die Milch. Am merkwürdigsten ist aber der Befund, daß in der Butter, welche fast alle Fette der Milch enthält, der Fermentgehalt äußerst gering ist. Soweit die Hauptmasse des Ferments im Rahm enthalten ist, so muß offenbar bei der Aufarbeitung des Rahmes auf Butter das Ferment entweder zugrunde gehen oder in der Buttermilch zurückbleiben, indem es sich von den Fetttröpfchen loslöst. Eine quantitative Untersuchung ergab, daß *1 ccm der Buttermilch durchschnittlich 0,0131 mg N_2O_3 liefert*. Diese Tatsache kann nur so erklärt werden, daß das Ferment unter der energischen mechanischen Einwirkung, welcher der Rahm im Apparat zur Buttergewinnung ausgesetzt wird, von seinem Träger, den Fetttröpfchen, losgelöst wird. Die zu einer kompakten Masse — der Butter — zusammengeballten Fetttröpfchen enthalten nunmehr bloß Spuren des Ferments. *Dixon* und *Thurlow* erklären die höhere Aktivität des Rahmes durch eine vermutliche aktivierende Wirkung des Fettes. Sie weisen darauf hin, daß der Zusatz von gekochtem Rahm die Entfärbung des Methylenblaus durch Milch beschleunigt. Jedoch ist es viel wahrscheinlicher, daß in ihren Ver-

suchen nicht das Fett, sondern die Eiweißstoffe des gekochten Rahmes den beschleunigenden Einfluß ausübten. Eine ähnliche Erscheinung haben *Bach*, *Sbarsky* und *Nikolaeff* (9) bei Serumzusatz beobachtet.

Es wurde demnach die Buttermilch als Ausgangsmaterial zur Gewinnung des Ferments gewählt[1]). Abgesehen vom hohen Fermentgehalt, hat dieses Material noch den Vorzug, daß es bedeutend weniger Nebenstoffe enthält als die Vollmilch. Sein spezifisches Gewicht ist 1,032 bis 1,035, sein Fettgehalt 0,3 bis 0,5 Proz.

Zur Isolierung des Ferments aus der Buttermilch wurden von uns die üblichen Fällungsmittel angewandt, nämlich Alkohol, Sulfate, Phosphorwolframsäure usw., jedoch erhielten wir dabei im Niederschlag nur sehr geringe oder gar keine Fermentmengen. Befriedigende Resultate erhielten wir nur bei Anwendung von Aceton. 1 Liter frischer Buttermilch wird mit 3 Litern frisch destillierten Acetons gefällt. Nach 1 bis 2 Stunden wird die völlig klare Flüssigkeit vom Bodensatz dekantiert. Der Niederschlag wird acetonfrei abgenutscht. Zur vollständigen Entwässerung wird der Rückstand nochmals im Mörser mit Aceton verrieben. Das Pulver wird dann auf Filtrierpapier ausgebreitet und zum Verdunsten des Acetons an der Luft liegengelassen. Das völlig trockene, acetonfreie Präparat wird im Soxhlet mit Petroläther ½ bis 1 Stunde zum Entfetten extrahiert. Man erhält so ein feines, weißes Pulver. Die Ausbeute beträgt 40 bis 50 g, je nach der Beschaffenheit der Buttermilch. Mit Wasser angerührt, bildet es eine feine Suspension, welche, in Anwesenheit von Aldehyd, Methylenblau entfärbt und Nitrate zu Nitriten reduziert. Durch Aufkochen wird das Präparat inaktiviert.

Die Aktivität dieses Präparats wurde auf folgende Weise bestimmt: 0,05 g wurde in 1 ccm Wasser suspendiert, 0,5 ccm einer 2proz. Acetaldehydlösung und 1 ccm $NaNO_3$-Lösung (10proz.) zugesetzt und eine halbe Stunde bei 65⁰ stehengelassen. Es wurde dabei 0,0326 mg N_2O_3 gebildet. *Dies entspricht ungefähr der Aktivität von 12 ccm frischer Milch.* Das so gewonnene Präparat enthält noch große Mengen von Eiweiß und anderen Bestandteilen der Milch, welche mit dem Ferment niedergeschlagen wurden. Wir suchten durch nachträgliches Auflösen des Präparats und Wiederausfällen es von diesen Beimengungen zu befreien. Aber schon dieses trockene Präparat bietet bedeutende Vorzüge bei der Arbeit im Vergleich zur gewöhnlichen Milch. Im verschlossenen Gefäß behält es lange Zeit seine Aktivität. Nach der

[1]) Wird die Buttermilch von einem Milchgeschäft bezogen, so ist darauf zu achten, daß der zur Butterbereitung angewandte Rahm frisch und nicht vorgewärmt sei. Zur Gewinnung der Perhydridase muß die Buttermilch möglichst bald nach der Butterbereitung angewandt werden.

oben angegebenen Methode wird das Ferment fast quantitativ aus der Buttermilch gewonnen, wie aus folgenden Berechnungen zu ersehen ist: 1 ccm Buttermilch liefert 0,0131 mg N_2O_3, 1 Liter würde also 13,1 mg N_2O_3 entsprechen. Aus 1 Liter haben wir 40 g Fermentpräparat gewonnen, von welchem 0,05 g 0,0326 mg lieferten; die ganze Menge entspricht somit 13 mg N_2O_3. 1 ccm der ursprünglichen Milch gab 0,0027 mg N_2O_3. *Die Reduktionsfähigkeit unseres Präparats ist also 240mal höher als diejenige der Milch.*

Das von uns gewonnene Präparat ist in reinem Wasser so gut wie unlöslich. Wir versuchten daher die Bedingungen festzustellen, unter welchen es in Lösung gebracht werden kann.

Bereits *Seligmann*, *Smidt* u. a. versuchten das Ferment aus dem Rahm durch Ausschütteln mit Wasser zu gewinnen, jedoch ohne Erfolg. Wird unser Präparat mit Wasser geschüttelt und dann zentrifugiert, so gehen keine merklichen Mengen des Ferments in Lösung. Wir fanden aber, daß es sich in schwach (mit HCl) angesäuertem Wasser löst. 10 g des Fermentpulvers werden im Mörser mit 40 ccm n/200 HCl angerührt und einige Tage unter Toluol im Eisschrank stehengelassen. Dann wird die Flüssigkeit durch ein Faltenfilter filtriert. Das so gewonnene Filtrat ist völlig klar, schwach gelblich und enthält das Ferment in sehr aktivem Zustande. 0,1 ccm dieser Lösung, mit 1 ccm $NaNO_3$ (6proz.) und 0,4 ccm Aldehyd (2proz.) vermischt, liefert nach viertelstündigem Aufbewahren bei 60° 0,0337 mg N_2O_3. Eine aufgekochte Probe erwies sich als vollständig inaktiv. Diese Fermentlösung ist also viermal aktiver als die Emulsion des Trockenpulvers. Dies ist wahrscheinlich nur so zu erklären, daß nach der Bearbeitung des Trockenpulvers mit einer schwachen (n/200) Salzsäurelösung das Ferment von den begleitenden Eiweißstoffen losgerissen und besser gelöst wird.

Im Vergleich mit der ursprünglichen Milch war diese Fermentlösung etwa 480mal konzentrierter.

Die Menge der Trockensubstanz, die in Lösung übergeht, wurde folgendermaßen bestimmt: 1 ccm der Lösung wurde im Wasserbad in einem Platintiegel eingedampft, bei 105° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Der Rückstand betrug 0,07 g. Von 10 g des Fermentpulvers gingen also in die Lösung (0,07 × 40) nur 2,8 g, d. h. etwa 25 Proz., über. Diese Lösung enthielt Eiweißstoffe und Kohlenhydrate.

Versuche über die weitere Reinigung des Ferments sind im Gange.

Die Entfärbung des Methylenblaus durch das isolierte Ferment.

Außer der Reduktion der Nitrate untersuchten wir auch die Entfärbung des Methylenblaus durch das isolierte Ferment.

In Anwesenheit von 0,5 ccm Acetaldehyd (2 proz.) und 0,5 ccm Methylenblaulösung ($^1/_{5000}$) wird das Gemisch *schon in der Kälte* durch 0,1 ccm der Fermentlösung *momentan* entfärbt. *Morgan*, *Stewart* und *Hopkins* mußten, um 0,3 ccm der gleichen Methylenblaulösung bei Erwärmen während 1 Minute zu entfärben, 5 ccm Milch anwenden. Unter diesen Bedingungen waren sie imstande, die zur Entfärbung erforderliche Zeit zu messen. Bei der Untersuchung des isolierten Ferments mußten wir entweder eine größere Konzentration oder größere Mengen der Methylenblaulösung anwenden. Um die Entfärbung des Methylenblaus in einer Minute zu erzielen, mußten wir zu 0,1 ccm Fermentlösung 1,5 ccm, und in Anwesenheit von Hypoxanthin statt Acetaldehyd sogar 2,5 ccm der Methylenblaulösung zufügen. Bei der Reduktion des Methylenblaus war also unser Perhydridasepräparat etwa 400 mal aktiver als die Milch. *Die Wirksamkeit des isolierten Ferments bleibt die gleiche, sei es, daß man Nitrate oder Methylenblau als reduzierbares Substrat anwendet.*

Einfluß der Temperatur.

Nach *Bach* liegt die optimale Temperatur für die Perhydridase der Milch zwischen 60 bis 70°. Da er seine Versuche mit Milch durchführte, so hielten wir es für notwendig, dieselben Versuche mit dem isolierten Ferment zu wiederholen. 3 ccm der Fermentlösung wurden mit 27 ccm Wasser verdünnt, und von dieser Lösung wurde je 1 ccm mit 1 ccm Natriumnitratlösung (10 proz.) und 0,4 ccm Acetatdehyd (2 proz.) versetzt, eine halbe Stunde bei verschiedenen Temperaturen zwischen 35 bis 85°, mit Intervallen von 10° aufbewahrt. Bei sämtlichen, im nachstehenden angeführten Versuchen konnten wir *die Fällung mit Bleiacetat vermeiden*, da die Gemische gänzlich klar und farblos blieben. Die kolorimetrischen Bestimmungen der gebildeten Nitritmengen konnten daher direkt in der oben angegebenen Weise ausgeführt werden.

Resultate:

Temperatur .	35	45	55	65	75	85°
N_2O_3. . . .	0,0168	0,0261	0,0321	**0,0329**	0,0218	0,0087 mg

Das Optimum der Wirkung des isolierten Ferments liegt also bei 65°, was mit der Erfahrung *Bachs* übereinstimmt.

Die Versuchsdauer des Rückgangs der Nitrite.

Das Maximum der Nitritbildung wird in den Versuchen von *Bach* mit Milch nach einer halben Stunde erreicht, bei längerer Dauer nimmt die Nitritmenge ab. Mit dem isolierten Ferment erreichen wir das Maximum bereits nach 10 Minuten. 5 ccm der Fermentlösung wurden in einem kleinen Kolben mit 5 ccm Natriumnitratlösung (10 proz.) und

2,5 ccm Acetaldehyd (2proz.) vermischt und im Thermostaten bei 65° aufbewahrt. In Intervallen von 5 Minuten wurde je 1 ccm zur Bestimmung der gebildeten Nitrite entnommen. Unser Ferment reduzierte aber das Nitrat so energisch, daß die direkte Kolorimetrierung durch intensive Färbung gestört wird. Infolgedessen waren wir gezwungen, jedes Kubikzentimeter mit 9 ccm Wasser zu verdünnen und dann erst in 1 ccm dieses Gemisches die Kolorimetrierung vorzunehmen.

Resultate:

Zeitdauer . .	5	10	15	20	30	40 Minuten
N_2O_3	0,066	0,069	0,067	0,060	0,057	0,055 mg

Wie ersichtlich, beginnt schon nach 10 Minuten langer Einwirkung des Ferments ein Rückgang der entstandenen Nitrite. Wie es schon *Bach* betonte, verlaufen Bildung und Zerstörung der Nitrite gleichzeitig; am Beginn der Fermentwirkung gestaltet sich die Resultierende zugunsten der Bildung, in den späteren Phasen wird mehr Nitrit zerstört als gebildet, so daß eine Abnahme der vorhandenen Nitritmengen zustande kommt.

Wirkung des isolierten Enzyms in Anwesenheit verschiedener Sauerstoffakzeptoren.

Wie bereits erwähnt, bewirkt die frische Milch die Reduktion des Methylenblaus oder der Nitrite in Anwesenheit verschiedener Sauerstoffakzeptoren; *Schardinger* wandte Formaldehyd an, *Bach* Acetaldehyd oder andere Aldehyde und auch Proteinabbauprodukte, *Morgan*, *Stewart* und *Hopkins* Xanthin und Hypoxanthin. Es war von Interesse festzustellen, ob auch das isolierte Ezym die genannten Sauerstoffakzeptoren zur Herstellung eines oxydoreduzierenden Systems verwerten kann.

Ein Gemisch von 0,1 ccm unserer Enzymlösung und 1,5 ccm Methylenblaulösung werden mit 0,4 ccm Formaldehydlösung (1proz.) oder mit 0,5 ccm Acetaldehydlösung (2proz.), oder mit Salicylaldehydlösung, oder mit *Liebigs* Extrakt, oder mit Hypoxanthin versetzt. Zur völligen Entfärbung der Gemische bei Zimmertemperatur (18°) waren folgende Zeiten erforderlich:

Sauerstoffakzeptoren	Formaldehyd	Acetaldehyd	Salicylaldehyd
Zeiten	60′	40′	50′

Sauerstoffakzeptoren	Liebigs Extrakt	Hypoxanthin
Zeiten	40′	30′

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß *das isolierte Enzym katalytisch auf dieselben Substrate wie die Milch einwirkt, was für die Einheitlichkeit des oxydoreduzierenden Enzyms der Milch spricht.*

Die Redukase als Gemisch von Schardingerenzym (Perhydridase) und Sauerstoffakzeptoren.

Die Beziehungen des Schardingerenzyms zu der Redukase der Gewebe wurden bereits von *Bach* klargestellt. Er zeigte, daß die Redukase der Leber in ein Enzym, welches mit dem Schardingerschen identisch ist, und ein Koenzym, welches aus Proteinabbauprodukten besteht, zerlegt werden kann. *Bachs* Befund wurde von *Morgan, Stewart* und *Hopkins* völlig bestätigt und dahin präzisiert, daß unter den Proteinabbauprodukten Xanthin und Hypoxanthin als spezifische Sauerstoffakzeptoren fungieren. Mit dem isolierten Enzym der Milch und *Liebigs* Extrakt läßt sich ein Präparat darstellen, *welches eine echte Redukase vortäuscht.* Wird 1 g trockenes Enzympräparat mit 1 g trockenem Liebigs Extrakt verrieben, so erhält man ein Pulver, welches in wässeriger Lösung Farbstoffe entfärbt und Nitrate zu Nitriten reduziert.

Zusammenfassung.

1. Die auf der Methylenblauentfärbung begründete Methode der quantitativen Perhydridasebestimmung ist aus mehreren Gründen als unzulänglich zu betrachten. Als gut geeignet für quantitative Untersuchungen hat sich die von *Bach* vorgeschlagene Methode der Nitratreduktion erwiesen.

2. Mit dieser Methode durchgeführte Untersuchungen der einzelnen Bestandteile der Milch haben gezeigt, daß die Hauptmasse der Perhydridase im Rahm aufzufinden ist. Sowohl Magermilch wie auch Butter enthalten bloß Spuren des Enzyms. Bei der Gewinnung der Butter bleibt die Perhydridase in der Buttermilch zurück. Letztere wurde als Ausgangsmaterial zur Isolierung der Perhydridase gewählt.

3. Die Buttermilch wird mittels Aceton gefällt, der Niederschlag getrocknet und mit Petroläther im Soxhletapparat extrahiert. Das erhaltene Pulver (40 bis 50 g pro Liter Buttermilch) ist stark aktiv, in Wasser so gut wie unlöslich. Durch Digerieren mit n/200 HCl wird das Enzym in Lösung gebracht, man erhält dabei eine Lösung, die 480mal aktiver als Milch ist.

4. Das isolierte Ferment vermag sowohl Nitrate zu Nitriten, wie auch Methylenblau zu der entsprechenden Leucobase zu reduzieren.

5. Das Temperaturoptimum des isolierten Ferments liegt bei 60°.

6. Die maximale Nitritmenge wird bereits nach 10 Minuten erreicht. Bei längerer Versuchsdauer geht die Menge des vorhandenen Nitrits zurück.

7. Als Sauerstoffakzeptoren für die Wirkung des isolierten Ferments können Aldehyde, Eiweißabbauprodukte, Xanthin und Hypoxanthin fungieren. Es wird dadurch die Identität des Schardingerenzyms, Purinoxydase und der Perhydridase der Gewebe festgestellt.

Literatur.

1) *Schardinger*, Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel 5, 1113. — 2) *A. Bach*, diese Zeitschr. **31**, 443, 1911; **33**, 282, 1911; **38**, 154, 1912; **52**, 412, 1913; **58**, 205, 1914. — 3) *Morgan*, *Stewart* and *Hopkins*, Proc. Roy. Soc. **94**, 1922. — 4) *Dixon* and *Thurlow*, Biochem. Journ. **18**, 971, 1924. — 5) *Seligmann*, Handbuch der Milchkunde, herausgegeben von Sommerfeld, 1909, S. 306. — 6) *Smidt*, Arch. f. Hyg. **58**, 313. — 7) *Aloy* und *Valdiguie*, Comt. rend. Soc. Biol. **85**, 333, 1921. — 8) *Hass* and *Hill*, Biochem. Journ. **18**, 671, 1923. — 9) *Bach*, *Sbarsky* und *Nikolaeff*, diese Zeitschr. **135**, 32, 1923.

Adsorption von Eiweißabbauprodukten durch die Formelemente des Blutes in vivo und in vitro.

IV. Mitteilung[1]):

Die Adsorption von einigen Aminosäuren durch die roten Blutkörperchen.

Von

B. Sbarsky und **A. Muchamedoff.**

(Aus dem biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.)

(Eingegangen am 17. Januar 1925.)

Der eine von uns (*Sbarsky*) (1) zeigte, daß rote Blutkörperchen die Fähigkeit besitzen, Eiweißabbauprodukte zu adsorbieren, die nach Zerstörung der Formelemente durch Erhitzen frei gemacht werden. Als Abbauprodukte benutzte er eine Lösung von Erepton (das Endprodukt der Hydrolyse des Fleischeiweißes) und das Diphtherietoxin, d. i. ein Gemisch von Eiweiß, Peptonen, Aminosäuren usw. Es schien von Interesse, die Adsorptionsfähigkeit der Erythrocyten gegenüber einzelnen isolierten Aminosäuren zu untersuchen.

In der Literatur finden wir einige Arbeiten über die Beziehung zwischen roten Blutkörperchen und Aminosäuren. Vor einigen Jahren wurde die Frage über das Schicksal jenseits der Darmwand der Abbauprodukte, die man durch Eiweißverdauung erhält, von manchen Autoren untersucht.

Costantino, *Van Slyke*, *Meier*, *Folin*, *Denis*, *Rona*, *Bang* und andere konnten mit absoluter Sicherheit feststellen, daß die Aminosäuren der Eiweißverdauung durch den Darm ohne Veränderung in das Blut gelangen.

Besondere Beachtung verdienen die Angaben von *Costantino* (2). Während andere Autoren nur das Serum untersuchten, wurde von *Costantino* zum ersten Male sowohl das Serum wie die Formelemente des Blutes auf ihren Gehalt an Aminosäuren untersucht. Es gelang

[1]) Erste, zweite und dritte Mitteilung, diese Zeitschr. **135**, 21; **141**, 33; **141**, 37, 1923.

ihm zu beweisen, daß die Erythrocyten stets mehr Aminosäuren als das entsprechende Serum enthalten. Dieser interessante Befund wurde von *Costantino* in vitro näher erforscht. Wenn man nämlich einer Emulsion von Erythrocyten einzelne Aminosäuren (Glykokoll, Alanin und Asparagin) hinzufügt, so zeigt sich, daß dieselben in den Erythrocyten angespeichert werden. Diese Erscheinung erklärte *Costantino* durch die „Permeabilität" der Erythrocyten für Aminosäuren und, da in seinen Versuchen diese Speicherung in den kernhaltigen Erythrocyten (bei Vögeln) viel ausgesprochener war, so glaubte er, daß die Aminosäuren an dem Stoffwechsel der Erythrocyten teilnehmen.

Die Frage über die Verteilung der ins Blut gelangenden Aminosäuren zwischen Plasma und Formelemente wurde auch von *Bang* (3) erörtert. Er fand, daß, wenn man einem Tiere Glykokoll oder Alanin per os darreicht, eine Vermehrung der Aminosäuren im Blute zu bemerken ist, jedoch war kein Unterschied in den Aminosäuremengen zwischen Plasma und Formelementen festzustellen. Da in den isotonischen Lösungen von Alanin und Glykokoll keine Hämolyse der Erythrocyten stattfand, zog *Bang* den Schluß, daß dieselben für Aminosäuren unpermeabel sind. Den verschiedenen Gehalt an Aminosäuren im Plasma und in den Formelementen wollte er damit erklären, daß die Aminosäuren der Erythrocyten das Resultat des fermentativen Abbaus des Eiweißes der roten Blutkörperchen darstellen.

Die Ursache dieser sich widersprechenden Resultate konnte man einerseits dadurch erklären, daß die erwähnten Autoren verschiedene Methoden anwandten, andererseits lag es sicher darin, daß *Costantino* die Aminosäuren den Erythrocyten in vitro hinzufügte, während *Bang* die Tiere mit Aminosäuren fütterte und nach verschiedenen Zeiträumen im Blute den Gehalt an Aminosäuren bestimmte.

Unsere Versuche wurden in vitro mit Kaninchenerythrocyten unter Zusatz von Glykokoll, Alanin, Tyrosin und Leucin (*Kahlbaum*) als Aminosäuren durchgeführt.

Vor dem Versuch hungerte das Tier während 12 Stunden. Das Blut, direkt dem Herzen oder der Art. carotis entnommen, wurde defibriniert, zentrifugiert, die Formelemente dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung (0,85 proz.) gewaschen und mit derselben emulgiert. Diese Emulsion wurde in eine Reihe Zentrifugiergläschen zu je 4 ccm verteilt und überall je 4 ccm Aminosäurelösung (etwa 1 : 2500) zugesetzt. Als Kontrollen wurden folgende Versuche angestellt: a) 4 ccm Erythrocytenemulsion und 4 ccm physiologischer Kochsalzlösung. In diesem Versuch wurden die stickstoffhaltigen Produkte bestimmt, welche aus den Erythrocyten ausgewaschen werden. b) 4 ccm physiologischer Salzlösung wurden mit 4 ccm der Aminosäurelösung versetzt. Dieser

Versuch diente dazu, den N-Gehalt der zugesetzten ursprünglichen Aminosäureslöung zu bestimmen. Alle Probierröhrchen wurden 45 Minuten im Thermostaten aufbewahrt und dann zentrifugiert. Von den Zentrifugaten wurden je 2 ccm abgemessen und mittels 1 ccm Phosphorwolframgemisches die Proteine ausgefällt. Es wird von neuem zentrifugiert und vom Zentrifugat 0,5 ccm zur Reststickstoffbestimmung entnommen. Letztere wurde nach der Mikromethode von *Folin* in der Modifikation von *Acel* (4) ausgeführt; es hat sich diese Methode als genügend exakt und einfach erwiesen.

Als Beispiel sollen die hier beigebrachten Resultate dienen:

Aminosäure	Menge des N		
	Erythrocyten, Aminosäure mg	Kontrolle a mg	Kontrolle b mg
Glykokoll	0,0140	0,0024	0,0162
Alanin	0,0125	0,0024	0,0136
Leucin	0,0135	0,0024	0,0090
Tyrosin	0,0137	0,0024	0,0086

Aus dieser Tabelle kann man ersehen, daß die physiologische NaCl-Lösung eine gewisse Menge N-haltiger Bestandteile aus den Blutkörperchen auswäscht. Die Kontrolle ergibt in diesem Falle 0,0024 mg N. Diese Menge kommt in den betreffenden Versuchen in Abzug. Die so erhaltene Zahl wird nun subtrahiert vom Stickstoffgehalt, welcher im zweiten Kontrollversuch (NaCl-Lösung und Aminosäure) gefunden wurde. Die auf diese Weise erhaltenen Zahlen sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Aminosäure	Menge des adsorbierten N	
	mg	Proz.
Glykokoll	0,0046	28,8
Alanin	0,0035	25,7
Leucin	0	0
Tyrosin	0	0

Für Glykokoll und Alanin erhalten wir somit eine Verminderung des N-Gehalts. In Wirklichkeit ist diese Verminderung noch erheblicher, als durch die angeführten Zahlen angegeben ist. Man muß nämlich berücksichtigen, daß, wenn wir im Hauptversuch 2 ccm des Zentrifugates abheben, die Aminosäurekonzentration hier höher sein müßte als in der Kontrolle, weil dabei das Volumen der Blutkörperchen nicht in Betracht genommen wird. Jedoch, ohne sogar diese Fehlerquelle zu berücksichtigen, erhalten wir für die Alaninadsorption 25,7 Proz. und für die Glykokolladsorption 28,8 Proz. Bei Tyrosin und Leucin ist keine Adsorption zu beobachten, und infolge des oben erwähnten

Fehlers erhalten wir im Hauptversuche sogar höhere N-Werte als in den Kontrollen.

Diese Versuche wurden vielmals wiederholt, indem wir einerseits die Erythrocytenmenge, andererseits die Menge der Aminosäure variierten, und erhielten dabei stets dasselbe Resultat, und zwar: das Glykokoll und Alanin werden durch die Erythrocyten in Mengen von 10 Proz. bis 40 Proz. adsorbiert, während Tyrosin und Leucin das nicht tun.

Was unsere Versuche mit Alanin und Glykokoll betrifft, so stimmen hier die erhaltenen Resultate mit denjenigen *Costantinos* überein; mit Tyrosin und Leucin hatte dieser Autor keine Versuche angestellt.

Zusammenfassung.

In Zusammenhang mit früheren Untersuchungen wurde die Adsorption einzelner Aminosäuren durch die Formelemente des Blutes erörtert. Es erwies sich dabei, daß, während Leucin und Tyrosin gar nicht adsorbiert werden, von Glykokoll und Alanin 10 bis 40 Proz. der zugesetzten Menge durch die Erythrocyten adsorbiert werden.

Literatur.

1) *B. Sbarsky*, diese Zeitschr. **135**, 21, 1923. — 2) *A. Costantino*, ebendaselbst **55**, 411. — 3) *I. Bang*, ebendaselbst **74**, 278 und 294. — 4) *D. Acel*, ebendaselbst **121**, 120.

Zur Frage der künstlichen und natürlichen Phosphorylierung des Zuckers.

Von

C. Neuberg und M. Kobel.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Vor längerer Zeit haben *C. Neuberg* und *H. Pollak*[1]) gezeigt, daß man künstlich in das Molekül des Zuckers Phosphorsäurereste einführen kann. Die so entstehenden Ester haben auch, da sie sich der fermentativen Spaltung zugänglich erwiesen haben, physiologisches Interesse erlangt[2]). Die Methode, die zur Gewinnung dieser Kohlenhydrat-Phosphorsäure-Verbindungen verwendet wurde, ist verschieden von den Vorgängen, die sich bei den biologischen Prozessen abspielen können. Sie beruht auf der Behandlung des Zuckers mit Phosphoroxychlorid in Gegenwart säurebindender Basen und vollzieht sich nach der Gleichung: $2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,POCl_3 + 5\,M_2O = 6\,MCl + H_2O + 2\,C_6H_{11}O_5 \,.\, O \,.\, PO_3M_2$. Dieses Verfahren hat sich auch zur Darstellung phosphorylierter Polysaccharide verwenden lassen, z. B. zur Bereitung einer Stärke-phosphorsäure[3]). In Anbetracht des Umstandes, daß in der Natur sowohl Hexose-di-phosphorsäure als Hexose-mono-phosphorsäure auftreten und Stärke wie Glykogen einen, wenn auch kleinen Gehalt an Phosphorsäure aufweisen, die allem Anschein nach organisch gebunden ist, haben wir wiederholt versucht[4]), unter solchen Bedingungen eine Phosphorylierung von Kohlenhydraten zu erreichen, die mit den natürlichen Vorgängen vergleichbar erschienen. Dabei haben wir in erster Linie an eine Reaktion des Zuckers mit anorganischen Phosphaten an Stelle des von uns erfolgreich verwendeten Chlorids der Phosphorsäure (s. oben) gedacht; allein den

[1]) *C. Neuberg* und *H. Pollak*, diese Zeitschr. **23**, 515; **26**, 514, 1910; vgl. *E. Fischer*, Chem. Centralbl. **1914**, II, 1050.

[2]) Literatur siehe bei *C. Neuberg*, Oppenheimers Handb. d. Biochem., 2. Aufl., **1**, 531, 1924.

[3]) *J. Kerb*, diese Zeitschr. **100**, 3, 1919; *M. Samec* und *A. Meyer*, Chem. Centralbl. **1923**, I, 46.

[4]) Vgl. diese Zeitschr. **23**, 517, 1910.

Versuchen ist bisher der Erfolg versagt geblieben. Wir hofften nun weiterzukommen unter Heranziehung der vor einiger Zeit von *O. Warburg* und *M. Yabusoe*[1]) sowie *O. Meyerhof* und *K. Matsuoka*[2]) studierten Autoxydation von Fruchtzucker in konzentrierten Phosphatlösungen. Hierbei handelt es sich zwar um eine Oxydation des Zuckers durch den eingeleiteten Sauerstoff, aber es wäre immerhin denkbar gewesen, daß eine vorherige Vereinigung des Kohlenhydrats mit der Phosphorsäure zu einer organischen Verbindung die Sauerstoffzehrung begünstigt hätte und irgend eine Fructose-Phosphorsäure-Verbindung nachweisbar geworden wäre. Dies ist, wie die nachstehend mitgeteilten Protokolle lehren, jedoch nicht der Fall. Wir haben zu keiner Zeit eine Phosphorylierung der unveränderten Fructose oder Eintritt des Phosphats in irgend eine organische Verkettung beobachten können. Dies Ergebnis ist auch nicht wunderbar, wenn man bedenkt, daß nach *Meyerhof* und *Matsuoka* Hexosediphosphat im Gegensatz zu freier Fructose gerade in Anwesenheit von starker Phosphatlösung gegen Sauerstoff beständig ist und die Oxydation des Fruchtzuckers eine Schwermetallkatalyse darstellt. Es sind nämlich Spuren von Eisen oder einem anderen mehrwertigen Metall erforderlich. Andererseits ist das Phosphation vollkommen entbehrlich, indem es glatt durch Arseniat ersetzt werden kann. Die Übertragungskatalyse des Sauerstoffs, die zu jener bemerkenswerten Oxydation des Zuckers führt, scheint also nicht an das intermediäre Auftreten eines organischen Phosphorsäurederivats gebunden zu sein. Damit im Einklang stehen unsere alten Beobachtungen[3]), daß die Oxydation des Zuckers (und auch anderer Substanzen, wie der Aminosäuren) im Lichte durch Spuren beliebiger Eisensalze (Ferrosulfat, Ferrichlorid) vermittelt wird.

Hierbei handelt es sich, wie seinerzeit dargetan wurde, um eine photokatalytische Wirkung, deren treibende Kraft im Licht gelegen ist und bei der die Eisensalze als Sauerstoffüberträger tätig sind, indem sie zu einer höherwertigen Stufe oxydiert werden und dann Sauerstoff an das Substrat abgeben. Im Lichte erfolgt dann von neuem die Beladung des Oxyduleisens mit Sauerstoff und so fort. Man hat demnach einen Kreisprozeß nach dem Schema Eisenperoxyd $\rightleftarrows$ Eisenoxydul. Auch bei diesen Photokatalysen kann das Eisen durch andere Metalle ersetzt werden, z. B. durch Uran und Cer[4]), ferner kann man Chinone und chinoide Farbstoffe verwenden[5]), die nach dem Typus Chinon $\rightleftarrows$ Hydrochinon wirken, also ganz analog dem Paradigma Superoxyd $\rightleftarrows$ Oxydul.

---

[1]) *O. Warburg* und *M. Yabusoe*, diese Zeitschr. **146**, 380, 1924.

[2]) *O. Meyerhof* und *K. Matsuoka*, ebendaselbst **150**, 1, 1924.

[3]) *C. Neuberg*, ebendaselbst **13**, 305, 1908; **28**, 279, 1910.

[4]) *C. Neuberg* und *E. Schwenk*, ebendaselbst **71**, 219, 1915.

[5]) *C. Neuberg* und *A. Galambos*, ebendaselbst **61**, 315, 1914; *C. Neuberg* und *W. H. Peterson*, ebendaselbst **67**, 63, 1914; *H. Meyer* und *A. Eckert*, M. **39**, 241, 1918.

Daß auch sonst die Verbrennung von Zucker durch atmosphärischen Sauerstoff nicht an die Gegenwart des Phosphations geknüpft ist, geht aus den Untersuchungen von *F. Framm*[1]) *H. Schade*[2]), *P. Mayer*[3]), *C. G. Mac Arthur*[4]), *A. Job*[5]) sowie *A. K. Goard* und *E. K. Rideal*[6]) hervor. Erwähnt sei, daß nach *O. Ruff*[7]) sich durch atmosphärischen Sauerstoff d-Glucose bei Gegenwart eines Ferrisalzes in d-Arabinose umwandeln läßt, also durch Aboxydation eines Kohlenstoffatoms.

In den erwähnten Untersuchungen haben *Meyerhof* und *Matsuoka* den Beweis dafür, daß die Fructose-oxydation in Phosphatlösung eine Schwermetallkatalyse ist, dadurch geliefert, daß sie in charakteristischer Weise durch Cyankalium und Pyrophosphat gehemmt wird, also durch Agenzien, die mit Eisen Komplexe bilden; diese sind offenbar stärker als die in alkalischem Milieu vorhandenen Komplexverbindungen des Zuckers mit Eisen, die *O. Baudisch*[8]) beschrieben hat. Interessant ist, daß nach *H. A. Spoehr*[9]) das komplexe Natrium-Ferro-pyrophosphat $Na_8Fe_2(P_2O_7)_3$ (ebenso wie das System Dinatriumphosphat + Methylenblau + Ferriphosphat) auf alle Hexosen und auch auf Disaccharide atmosphärischen Sauerstoff überträgt und CO_2 erzeugt.

Wenn also auch der Mechanismus der rein chemischen Zuckerzerstörung in alkalischer Lösung im allgemeinen und in Gegenwart alkalisch reagierender Phosphate im besonderen nicht mit einer nachweisbaren intermediären Phosphorylierung des Zuckers zusammenhängt, so erhob sich doch die Frage, ob nicht etwa die *biologische* Phosphorylierung mit einer Schwermetallkatalyse verknüpft wäre. Bekanntlich haben *A. Harden* und *W. J. Young* sowie *L. Iwanow* gezeigt, daß Hefe unter geeigneten Bedingungen mit Zucker und Phosphaten Hexose-phosphorsäure-ester erzeugt[10]). Die Frage ist nicht ganz geklärt, ob es eine unabhängige biologische Phosphorylierung gibt, oder ob mit ihr stets eine Umformung[11]) oder Spaltung des Zuckers einhergeht. Die letztere selbst ist im Falle der alkoholischen Zuckerspaltung ein Prozeß, der sich aus verschiedenen Teilreaktionen zusammensetzt, bei denen Oxydationen und Reduktionen abwechseln. Somit ist es a priori nicht ausgeschlossen, daß bei der Gärung Schwermetallkatalysen im Spiele sind. Orientierende Versuche, die Herr

[1]) *F. Framm*, Pflügers Arch. **64**, 587, 1896.
[2]) *H. Schade*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **57**, 1, 1906.
[3]) *P. Mayer*, diese Zeitschr. **32**, 1, 1911.
[4]) *C. G. Mac Arthur*, Chem. Centralbl. **1923**, III, 1413.
[5]) *A. Job*, C. r. **134**, 1052, 1902.
[6]) *A. K. Goard* und *E. K. Rideal*, Chem. Centralbl. **1924**, I, 2560.
[7]) *O. Ruff*, zitiert nach *G. Ollendorf*, Dissertation Berlin **1900**, S. 6.
[8]) *O. Baudisch*, B. **50**, 652, 1917.
[9]) *H. A. Spoehr*, Chem. Centralbl. **1924**, II, 937.
[10]) Literatur siehe bei *C. Neuberg*, Oppenheimers Handb. d. Biochem., 2. Aufl., **2**, 442, 1925.
[11]) Vgl. *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **155**, 354, 1925.

O. Warburg und ich schon vor längerer Zeit ausgeführt haben, berechtigen noch zu keinen endgültigen Schlußfolgerungen. Nach einer alten Angabe von *R. Fiechter*[1]) soll Blausäure stärker auf die Gärung als die Atmung lebender Hefezellen wirken, also an verschiedenen Atomgruppen angreifen, außerdem soll sie die Zellvermehrung bedeutend herabsetzen. Ferner haben *E.* und *H. Buchner* und *M. Hahn*[2]) gezeigt, daß auch die zellfreie Gärung durch Blausäure nicht irreversibel gehemmt wird, indem einfaches Überleiten von Luft genügt, um die zuckerspaltende Kraft des Preßsaftes wieder herzustellen in dem Maße, als die Blausäure verjagt wird. Ein gleiches hatte *Schönbein* für das Gärvermögen von Hefezellen angegeben. Diese Untersuchungen über die Einwirkung der Blausäure sind sämtlich bei saurer Reaktion angestellt, wo die komplexbildende Kraft der Cyanwasserstoffsäure bekanntermaßen gering oder nicht vorhanden ist. Wir haben nun nach dieser Richtung hin zunächst den einfachen Prozeß der Phosphatbindung geprüft, der sich im alkalischen Medium durchführen läßt. Das Optimum für die Reaktion liegt zwar nach *H. v. Euler* und *F. Nordlund*[3]) bei $p_H = 6{,}4$, aber die Phosphorylierung mittels Hefe ist auch bei $p_H = 8{,}4$ zu erreichen. Dieser Vorgang der biologischen Phosphorylierung wird bei $p_H = 8{,}4$ durch Zugabe selbst großer Mengen von Cyankalium (Gehalt an KCN = n/100 bis n/50) nicht aufgehoben. Er verläuft sogar vollständig, wenn auch teilweise etwas verzögert. Scheinbar handelt es sich darum, daß zunächst die Reaktion unterbunden ist, dann aber setzt sie ein und geht nun glatt vonstatten. (Dasselbe Verhalten gibt *Fiechter* (l. c.) für die Gärung in saurem Milieu an; auch dort handelt es sich nicht um eine Austreibung von HCN als Gas.) Die Verlangsamung kann mehrere Gründe haben. Es kann sich um die Fortnahme eines Katalysators[4]) handeln, der Carbonylstruktur aufweist und erst neu gebildet werden muß (Cyanhydrinreaktion von Ketosäuren und Acetaldehyd). Sodann kann die Konkurrenz zweier verschiedener Komplexbildungen vorliegen, etwa derart, daß zunächst Cyankalium die Spuren Schwermetall mit Beschlag belegt und daraus langsam durch den träger reagierenden Zucker nach dem Massenwirkungsgesetz verdrängt wird, so daß das Gleichgewicht erst allmählich hergestellt wird. Eine weitere Möglichkeit besteht unter anderem darin, daß mit Fortdauer der Digestion die anfänglich alkalische Reaktion $p_H = 8{,}4$ vermindert[5])

[1]) *R. Fiechter*, Über den Einfluß der Blausäure auf Fermentvorgänge. Dissertation Basel 1875, S. 29.
[2]) *E.* und *H. Buchner* und *M. Hahn*, Zymasegärung, S. 182.
[3]) *H. v. Euler* und *F. Nordlund*, H. **116**, 243, 1921.
[4]) Vgl. *P. Boysen Jensen*, diese Zeitschr. **154**, 260, 1924.
[5]) *A. Fernbach*, C. r. **156**, 77, 1913.

wird und ein lockerer Komplex dabei zerfällt (Zerlegung durch Säure); denn zum Schluß, wenn alles Phosphat gebunden war, betrug p_H in unseren ersten Versuchen nur noch 6,8. Ferner wollen wir bemerken, daß nicht etwa eine oxydative Zerstörung der Blausäure in Betracht kommt; denn auch nach Beendigung der Versuche und sogar nach mehrtägigem Stehen ließ sich unveränderte Blausäure mittels Phosphorsäure frei machen und überdestillieren. Die Phosphorylierung ist die Umkehr einer hydrolytischen Erscheinung, nämlich der Phosphatasebetätigung. Nach vorliegenden Erfahrungen scheinen, soweit negativen Versuchen Beweiskraft zukommt, einfache Fermenthydrolysen [z. B. solche durch Trypsin und Emulsin[1])] nicht empfindlich gegen Cyankalium zu sein: wir haben jedoch eine komplette biologische Phosphorylierung bei höherer Alkalinität, also im Bereich stärkerer Cyankomplexwirkung, und zwar bei einem p_H von 8,4 bis 7,85 erreicht.

A. Fructose in Phosphatlösungen.

Versuch 1. 5 g Fructose wurden in 100 ccm m-Dinatriumphosphatlösung gelöst und 1 ccm m/10 Kupfersulfatlösung hinzugefügt ($p_H = 8{,}4$). (Vor Beginn des Versuchs wurden 5,0 ccm der Lösung abgenommen, auf 100,0 ccm aufgefüllt und der Phosphatgehalt in 5,0 ccm dieser verdünnten Lösung bestimmt.) Dann wurde bei 37° kohlensäurefreier Sauerstoff durch die Lösung geleitet und hinter diese eine Waschflasche mit Barytwasser geschaltet. Schon nach 20 Stunden hatte sich in der Vorlage ein dicker Niederschlag von Bariumcarbonat abgeschieden. Von Zeit zu Zeit wurden der Lösung Proben entnommen und der Phosphatgehalt wie bei der Anfangsbestimmung ermittelt.

Zeit	$Mg_2P_2O_7$	Zeit	$Mg_2P_2O_7$
Anfangsbestimmung .	0,0313	Nach 52 Stunden . .	0,0311
Nach 2 Stunden . .	0,0310	„ 72 „ . .	0,0309
„ 20 „ . .	0,0314		

Nach Beendigung des Versuchs wurde in einem Teil der Lösung die anorganische Phosphorsäure mit Magnesiamischung ausgefällt, das Filtrat mit starker Salpetersäure behandelt und im Rückstand auf organisch gebunden gewesene Phosphorsäure geprüft. Das Resultat war negativ.

Versuch 2. Derselbe Versuch wurde in neutraler Phosphatlösung (dargestellt aus primärem und sekundärem Phosphat) bei $p_H = 7{,}0$ wiederholt. Er verlief in gleicher Weise. Auch hier war zu keiner Zeit organisch gebundene Phosphorsäure nachweisbar.

Zeit	$Mg_2P_2O_7$
Anfangsbestimmung . .	0,0285
Nach 4 Tagen	0,0282

[1]) *E. Róna*, diese Zeitschr. 109, 279, 1920.

B. Glucose in Phosphatlösung.

Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei Versuch 1. Erst nach 4 Tagen hatte sich etwas Bariumcarbonat abgeschieden, dessen Menge innerhalb 14 Tagen nur wenig zunahm. Organisch gebundene Phosphorsäure ließ sich auch hier nicht nachweisen.

Zeit	$Mg_2P_2O_7$
Anfangsbestimmung . .	0,0257
Nach 14 Tagen	0,0255

C. Phosphorylierung mit Trockenhefe unter Zusatz von Cyankalium.

Versuch 1. 10 g Rohrzucker wurden in 50 ccm 0,3 mol. Dikaliumphosphat gelöst, 5 ccm n/10 Natronlauge, 0,65 ccm n Cyankalium, 2 ccm Toluol und 5 g Trockenhefe zugesetzt. $p_H = 8,4$. Cyankaliumkonzentration = n/100. Zu Beginn des Versuchs wurden 3,0 ccm der Lösung mit 6,0 ccm 2½proz. Ammoniaks versetzt, filtriert und davon 2,0 ccm mit Magnesiamischung gefällt. In Abständen von je 1 Stunde wurden weitere Phosphatbestimmungen in üblicher Weise gemacht. Temperatur 37° C.

Zeit	$Mg_2P_2O_7$	Zeit	$Mg_2P_2O_7$
Anfangsbestimmung . .	0,0170	Nach 2 Stunden . . .	0,0137
Nach 1 Stunde	0,0168	„ 3 „ . . .	0,0000

Nach Beendigung des Versuchs betrug $p_H = 6,8$. Das Gärgemisch wurde nun unter Zusatz von Phosphorsäure einer Wasserdampfdestillation unterworfen und im Übergegangenen die Blausäure als Berlinerblau identifiziert.

Versuch 2. Versuch 1 wurde mit der doppelten Cyankaliumkonzentration (n/50) wiederholt.

Zeit	$Mg_2P_2O_7$	Zeit	$Mg_2P_2O_7$
Anfangsbestimmung . .	0,0169	Nach 4 Stunden . . .	0,0135
Nach 1 Stunde	0,0170	„ 5 „ . . .	0,0023
„ 2 Stunden	0,0166	„ 6 „ . . .	0,0000
„ 3 „	0,0156		

Versuch 3. Zum Vergleich wurde derselbe Versuch ohne Zusatz von Cyankalium ausgeführt.

Zeit	$Mg_2P_2O_7$
Anfangsbestimmung . .	0,0176
Nach 1 Stunde	0,0106
Nach 2 Stunden . . .	0,0000

D. Phosphorylierung mit Hefesaft unter Zusatz von Cyankalium.

12,2 g Fructose und 6,4 g Dikaliumphosphat wurden in 122 ccm Hefesaft — bereitet aus 250 g Trockenhefe und 750 ccm Wasser durch 2½stün-

diges Stehen im Brutschrank und Zentrifugieren — gelöst, dazu wurden 1,3 ccm n KCN und 1,3 ccm Toluol hinzugefügt. Vor Beginn des Versuchs wurden 5,0 ccm abgenommen, mit 5,0 ccm Wasser verdünnt und während 5 Minuten im siedenden Wasserbade koaguliert. Dann wurde filtriert, 3,0 ccm davon wurden mit 3,0 ccm 2½proz. Ammoniak versetzt, wieder filtriert und 2,0 ccm davon mit Magnesiamischung gefällt. p_H zu Beginn des Versuchs 7,5.

Phosphorbestimmungen wie bei den vorhergehenden Versuchen.

Zeit	$Mg_2P_2O_7$	Zeit	$Mg_2P_2O_7$
Anfangsbestimmung . .	0,0185	Nach 6 Stunden . . .	0,0186
Nach 2 Stunden	Nach Augenmaß wie die Anfangsbestimmung	„ 22 „ . . .	0,0095
„ 3 „		„ 23 „ . . .	0,0102
„ 4 „		„ 29 „ . . .	0,0113
„ 5 „		„ 53 „ . . .	0,0142

p_H am Schluß des Versuchs = 6,8.

Vergleichsversuch nur mit Zucker.

Derselbe Versuch wurde ohne Zusatz von Cyankalium angestellt. p_H = 7,4.

Zeit	$Mg_2P_2O_7$	Zeit	$Mg_2P_2O_7$
Anfangsbestimmung . .	0,0197	Nach 6 Stunden . . .	0,0195
Nach 2 Stunden	Nach Augenmaß wie bei der Anfangsbestimmung	„ 22 „ . . .	0,0089
„ 3 „		„ 23 „ . . .	0,0093
„ 4 „		„ 29 „ . . .	0,0109
„ 5 „		„ 53 „ . . .	0,0136

p_H am Schluß des Versuchs 6,7. (Das Maximum lag vielleicht zwischen der 6. und 22. Stunde.)

E. Phosphorylierung mit Hefesaft und Kofermentzusatz unter Zugabe von Cyankalium.

Der Versuch wurde wie der erste Ansatz mit Hefensaft ausgeführt, nur wurde der Saft hier so dargestellt, daß statt des Wassers eine Koferment-lösung zur Mazeration der Trockenhefe benutzt wurde. (Das Koferment war durch Aufkochen von 1600 g frischer Hefe mit 800 ccm Wasser und Filtrieren gewonnen.) p_H der Lösung bei Beginn des Versuchs = 7,2.

Zeit	$Mg_2P_2O_7$	Zeit	$Mg_2P_2O_7$
Anfangsbestimmung . .	0,0207	Nach 6 Stunden . . .	0,0044
Nach 2 Stunden	0,0206	„ 22 „ . . .	0,0081
„ 3 „	0,0160	„ 29 „ . . .	0,0097
„ 4 „	0,0081	„ 53 „ . . .	0,0137
„ 5 „	0,0032		

p_H am Schluß des Versuchs 6,6.

Vergleichsversuch ohne Cyankalium.

p_H zu Beginn 7,1.

Zeit	$Mg_2P_2O_7$	Zeit	$Mg_2P_2O_7$
Anfangsbestimmung . .	0,0208	Nach 6 Stunden . . .	0,0041
Nach 2 Stunden	0,0162	„ 22 „ . . .	0,0077
„ 3 „	0,0020	„ 29 „ . . .	0,0092
„ 4 „	0,0028	„ 53 „ . . .	0,0127

p_H am Schluß des Versuchs 6,6.

Bei den Versuchen ist zumeist deutlich, daß nach einer maximalen Phosphatbindung wieder mehr Phosphationen auftreten.

F. Phosphorylierung mit Trockenhefe bei stärkerer Alkalinität mit und ohne Kaliumcyanid.

Durch reichlichen Zusatz von Natriumbicarbonat konnte die Alkalinität während des Versuchs hochgehalten werden. Wir führten deshalb einen Versuch wie C_1 aus, indem wir statt Natronlauge 2,0 g Natriumbicarbonat zufügten, von dem anfangs ein Teil ungelöst blieb. Der Verlauf der Umsetzung wurde wie üblich durch Phosphatanalysen verfolgt.

Zeit	p_H	$Mg_2P_2O_7$
Anfangsbestimmung . .	8,4	0,0152
Nach 1 Stunde	8,3	0,0130
„ 2 Stunden	8,0	0,0017
„ 3 „	7,9	0,0010
„ 4 „	7,85	0,0000

Bei dieser hohen Alkalinität verschwanden die zeitlichen Unterschiede bei Versuchen mit und ohne KCN fast ganz. Auch n/50 KCN hemmte nicht bei einer anfänglichen Alkalinität von p_H = 8,4 und einer Endalkalinität von p_H = 7,7.

Autorenverzeichnis.

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses.

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges. in Braunschweig.

